



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**RASTREIO SOROLÓGICO DE ALGUNS AGENTES DE ZOONOSES  
EM CANÍDEOS SILVESTRES NO NORTE DE PORTUGAL**

INÊS CAMILO BARATA BRAVO FERREIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**CONSTITUIÇÃO DO JÚRI**

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da  
Fonseca de Sampaio

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho  
Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

Dr. Nuno Gonçalo Carvalho Caroço dos  
Santos

**ORIENTADOR**

Dr. Nuno Gonçalo Carvalho Caroço dos  
Santos

**CO-ORIENTADOR**

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

2010

LISBOA

---

## **AGRADECIMENTOS**

Depois da longa caminhada que nos trouxe até aqui, quero reservar este “cantinho” para agradecer a todas as pessoas que, de alguma forma, me ajudaram e incentivaram a elaborar esta dissertação.

Ao meu orientador, Dr. Nuno Santos, pela paciência e disponibilidade que demonstrou em todos os momentos, mas sobretudo, pelo entusiasmo contagiante com que se dedica a novas oportunidades de trabalho, e também pelos maravilhosos passeios que partilhámos.

Ao meu co-orientador, Professor Doutor Luís Madeira de Carvalho, pelo apoio e sabedoria que me soube transmitir, mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao pessoal do PNPG, que tão bem me recebeu, ao Chico, pela amizade e boa disposição e pela curiosidade que despertou em mim para as pequenas maravilhas da natureza. Ao Sr. António Rebelo, pelo visível esforço e vontade de ajudar.

Ao CIBIO-UP (Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos), particularmente ao Dr. Francisco Álvares, pelo apoio no trabalho de campo e pelo financiamento que ofereceram. À Veranda (Associação para o Estudo e Conservação do Património de Montanha), pela disponibilidade de alojamento que proporcionou em Castro Laboreiro.

Ao Professor Doutor José Meireles e à Professora Doutora Isabel Fonseca, pela ajuda e conhecimentos que transmitiram e pela possibilidade de estagiar no Laboratório de Doenças Parasitárias da FMV-UTL. Ao CIISA (Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, FMV, UTL) pelo apoio financeiro que prestou. Ao Dr. Pedro Fabrica e à Merial Portuguesa – Saúde Animal, Lda pelo financiamento deste projecto.

À Doutora Sofia Nuncio, pela disponibilidade e orientação, e a toda a equipa do CEVDI (Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas), à Fátima Amaro, Ana Sofia Santos, Rita de Sousa e Isabel Carvalho, pela simpatia e disponibilidade com que me receberam.

Aos técnicos do LNIV (Laboratório Nacional de Investigação Veterinária do Porto), à Dra. Ângela Xufre do INETI (Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação), ao Dr. Ricardo Brandão e à Sara Roque, pelo contributo que deram para este trabalho.

Um obrigado especial à Helena Rio Maior e à Mónia Nakamura, pelo companheirismo, sabedoria e pelas histórias de lobos que tanto me encantaram! À Lúcia, pela amizade e infinita paciência para ensinar mais uma aprendiz.

Agradeço especialmente à minha companheira de estágio, de viagens, passeios e aventuras, Marta, um muito obrigado pela amizade e pelos bons momentos que partilhámos. Por fim, aos colegas e principalmente aos amigos que me acompanharam durante todo o percurso académico e o tornaram tão especial. Aos meus biólogos preferidos e à Rita, pela amizade e por estarem sempre presentes. À minha maravilhosa família, pelo apoio incondicional e pela eterna amizade e paciência para me aturarem, um obrigado muito especial pela motivação que me deram e por ajudarem a tornar este meu sonho possível.



## Rastreio sorológico de alguns agentes de zoonoses em canídeos silvestres no norte de Portugal

### Resumo

Ao longo dos tempos, a fauna silvestre tem contribuído, directa ou indirectamente, para a disseminação de doenças infecciosas transmissíveis ao Homem e aos animais domésticos. A crescente actividade humana, aliada ao aumento da densidade populacional e à facilidade de mobilidade de pessoas e animais que se observam nos dias de hoje, vieram favorecer a (re)emergência de diversas doenças um pouco por todo o mundo.

Neste contexto, elaborou-se um estudo transversal de várias doenças, na maioria zoonoses transmitidas por vectores, em canídeos silvestres do norte de Portugal. Procedeu-se ao rastreio sorológico de 81 indivíduos (amostras de soro, extracto de pulmão e exsudado da cavidade torácica), efectuado pela primeira vez em Portugal no lobo ibérico (*C. lupus*,  $n=44$ ) e na raposa vermelha (*V. vulpes*,  $n=37$ ), para os agentes *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* s.l., *Ehrlichia canis*, *Rickettsia conorii*, *Francisella tularensis*, *Dirofilaria immitis*, *Babesia canis*, *Leishmania infantum*, vírus Toscana (flebovírus) e *Toxoplasma gondii*, introduzindo assim novos conhecimentos gerais sobre as prevalências destes agentes no território português, que até agora só se conheciam em canídeos domésticos e humanos. A prevalência de anticorpos anti-*R. conorii* foi a mais elevada (13,8%,  $n=8$  *C. lupus*,  $n=3$  *V. vulpes*), seguida das seroprevalências de *T. gondii* (5,2%,  $n=4$  *V. vulpes*), *E. canis* (2,5%,  $n=1$  *C. lupus*,  $n=1$  *V. vulpes*), *B. canis* (2,5%,  $n=1$  *C. lupus*,  $n=1$  *V. vulpes*), *A. phagocytophilum* e *B. burgdorferi* s.l. (ambas 1,3%,  $n=1$  *C. lupus*), pela técnica de imunofluorescência indirecta (IFI). Apenas dois lobos apresentaram co-infecção (2,5%) por *R. conorii* com *A. phagocytophilum* e *B. burgdorferi* s.l., respectivamente. Não foram detectados anticorpos contra *L. infantum* e o vírus Toscana através da IFI, nem para *F. tularensis* pela técnica de aglutinação em placa. A aplicação de testes de imunomigração rápida para a detecção de antígenos de *D. immitis* também não revelou quaisquer resultados positivos. Este estudo permitiu ainda inferir sobre alguns factores de risco associados às doenças avaliadas, nomeadamente a espécie de hospedeiro, o sexo, a idade e a origem geográfica dos animais, bem como o estado de conservação das amostras.

De um modo geral, os resultados obtidos encontram-se abaixo da média das seroprevalências observadas em canídeos e outros mamíferos silvestres e domésticos da Europa, o que não invalida a necessidade da continuação dos programas de vigilância já existentes em Portugal e a sua aplicação noutras áreas do território nacional, de modo a melhorar a caracterização das doenças e os factores de risco associados às mesmas. Assim como é importante a implementação de medidas preventivas e de controlo das populações de vectores, tanto no ciclo silvático como no doméstico.

**Palavras-chave:** zoonoses; vectores; lobo-ibérico; raposa; sorologia; Portugal.



## Serologic survey of selected zoonosis agents in wild canids from Northern Portugal

---

### Abstract

Through the times, wild fauna have contributed directly or indirectly to the dissemination of infectious diseases transmittable to Man and other animals. Increasing human activity, along with the growth of population density and the ease of mobility of people and animals that is evident nowadays, have favored the (re)emergence of several diseases throughout the world.

In this context, a transversal study of selected diseases, mainly vector-borne zoonosis, was developed in wild canids from the north of Portugal. A total of 81 individuals (samples of sera, lung tissue extracts and exudate from the thoracic cavity) were subjected to a serologic survey, undertaken for the first time in Portugal in the Iberian wolf (*C. lupus*,  $n=44$ ) and the red fox (*V. vulpes*,  $n=37$ ), concerning the pathogenic agents *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* s.l., *Ehrlichia canis*, *Rickettsia conorii*, *Francisella tularensis*, *Dirofilaria immitis*, *Babesia canis*, *Leishmania infantum*, Toscana virus (phlebovirus) and *Toxoplasma gondii*, thus introducing new general knowledge on the prevalence of those agents in the portuguese territory, which was only known in domestic canids and humans so far. The prevalence of antibodies against *R. conorii* was the highest (13,8%,  $n=8$  *C. lupus*,  $n=3$  *V.vulpes*), followed by the seroprevalences of *T. gondii* (5,2%,  $n=4$  *V. vulpes*), *E. canis* (2,5%,  $n=1$  *C. lupus*,  $n=1$  *V.vulpes*), *B. canis* (2,5%,  $n=1$  *C. lupus*,  $n=1$  *V.vulpes*), *A. phagocytophilum* and *B. burgdorferi* s.l. (both 1,3%,  $n=1$  *C. lupus*), using the indirect immunofluorescence assay (IFA). Only two wolves demonstrated co-infection (2,5%) with *R. conorii* plus *A. phagocytophilum* and *B. burgdorferi* s.l., respectively. No antibodies were detected against *L. infantum* or the virus Toscana by IFA, neither for *F. tularensis* using the plate agglutination method. Rapid immunomigration tests were applied to detect antigens of *D. immitis*, but no positive results were attained. It was also possible to infer from this study some of the risk factors associated with the respective diseases, namely the host species, their sex, age and geographic origin, as well as the conservation state of the samples.

Although the general results obtained from this survey are below the average seroprevalences observed in canids and other wild and domestic mammals in Europe, one must not underestimate the need of continuing the vigilance programmes already existing in Portugal and their application in other areas of the national territory, in order to improve the characterization of diseases and the associated risk factors. As well as it becomes important to implement preventive and control measures of the vector populations, in the wild cycle as much as in the domestic cycle.

**Keywords:** zoonosis; vectors; iberian wolf; red fox; serology; Portugal.



## ÍNDICE GERAL

<b>Capítulo I. Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo II. Actividades desenvolvidas durante o estágio curricular .....</b>	<b>3</b>
1. Parque Nacional da Peneda-Gerês .....	3
2. Laboratório de Parasitologia da FMV .....	8
3. Laboratórios do CEVDI.....	8
<b>Capítulo III. Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>9</b>
1. Doenças associadas a vectores.....	9
1.1. Doenças causadas por bactérias .....	10
1.1.1. Anaplasmose granulocítica canina.....	10
1.1.1.1. Etiologia e Epidemiologia .....	10
1.1.1.2. Patogenia e Sintomas.....	12
1.1.1.3. Diagnóstico.....	13
1.1.1.4. Tratamento .....	14
1.1.1.5. Prevenção .....	14
1.1.2. Borreliose de Lyme canina.....	15
1.1.2.1. Etiologia e Epidemiologia .....	15
1.1.2.2. Patogenia e Sintomas.....	16
1.1.2.3. Diagnóstico.....	17
1.1.2.4. Tratamento .....	21
1.1.2.5. Prevenção .....	21
1.1.3. Erliquiose monocítica canina.....	22
1.1.3.1. Etiologia e Epidemiologia .....	22
1.1.3.2. Patogenia e Sintomas.....	23
1.1.3.3. Diagnóstico.....	24
1.1.3.4. Tratamento .....	25
1.1.3.5. Prevenção .....	26
1.1.4. Febre botonosa canina .....	26
1.1.4.1. Etiologia e Epidemiologia .....	26
1.1.4.2. Patogenia e Sintomas.....	29
1.1.4.3. Diagnóstico.....	29
1.1.4.4. Tratamento .....	31
1.1.4.5. Prevenção .....	32
1.1.5. Tularémia canina .....	32
1.1.5.1. Etiologia e Epidemiologia .....	32
1.1.5.2. Patogenia e Sintomas.....	35
1.1.5.3. Diagnóstico.....	36
1.1.5.4. Tratamento .....	40
1.1.5.5. Prevenção .....	41
1.2. Doenças causadas por nemátodes.....	42
1.2.1. Dirofilariose canina .....	42
1.2.1.1. Etiologia e Epidemiologia .....	42
1.2.1.2. Patogenia e Sintomas.....	44
1.2.1.3. Diagnóstico.....	45
1.2.1.4. Tratamento .....	47
1.2.1.5. Prevenção .....	48
1.3. Doenças causadas por protozoários.....	49
1.3.1. Babesiose canina.....	49
1.3.1.1. Etiologia e Epidemiologia .....	49
1.3.1.2. Patogenia e Sintomas.....	51
1.3.1.3. Diagnóstico.....	52
1.3.1.4. Tratamento .....	53
1.3.1.5. Prevenção .....	54



1.3.2.	Leishmaniose canina .....	54
1.3.2.1.	Etiologia e Epidemiologia .....	54
1.3.2.2.	Patogenia e Sintomas.....	57
1.3.2.3.	Diagnóstico.....	59
1.3.2.4.	Tratamento .....	61
1.3.2.5.	Prevenção .....	62
1.4.	Doenças causadas por vírus.....	63
1.4.1.	Flebovírus – Vírus Toscana .....	63
1.4.1.1.	Etiologia e Epidemiologia .....	63
1.4.1.2.	Patogenia e Sintomas.....	64
1.4.1.3.	Diagnóstico.....	64
1.4.1.4.	Tratamento e Prevenção .....	65
1.5.	Controlo de vectores.....	65
2.	Toxoplasmose.....	66
2.1.	Etiologia e Epidemiologia.....	66
2.2.	Patogenia e Sintomas .....	69
2.3.	Diagnóstico .....	70
2.4.	Tratamento .....	73
2.5.	Prevenção.....	73

#### **Capítulo IV. Rastreio sorológico de alguns agentes de zoonoses em canídeos**

<b>silvestres no norte de Portugal.....</b>	<b>75</b>
1. Objectivos .....	75
2. Materiais e Métodos .....	75
2.1. Colheita de amostras e enquadramento geográfico .....	75
2.2. Imunofluorescência indirecta.....	76
2.3. Aglutinação em placa.....	77
2.4. Imunomigração rápida .....	78
2.5. Necropsias.....	78
2.6. Métodos estatísticos .....	79
3. Resultados .....	80
3.1. Imunofluorescência indirecta.....	85
3.2. Aglutinação em placa.....	87
3.3. Imunomigração rápida .....	87
3.4. Necropsias.....	87
3.5. Resultados estatísticos .....	89
4. Discussão.....	96

#### **Capítulo V. Conclusões .....**

#### **Bibliografia .....**

#### **Anexos.....**

A.	Instalações do CRFS-PNPG, animais em recuperação e actividades desenvolvidas durante o estágio .....	119
B.	Mapa da distribuição geográfica das amostras de dejectos colhidos na área do PNPG, de acordo com a espécie.....	121
C.	Tabela de registo das amostras dos animais analisados .....	122
D.	Tabela com os resultados observados nas amostras dos animais analisados.....	125
E.	Protocolo realizado para o teste de IFI de <i>L. infantum</i> , segundo as recomendações do fabricante .....	128
F.	Protocolo realizado para o teste de IFI de <i>B. canis</i> , segundo as recomendações do fabricante .....	129
G.	Protocolo realizado para o teste de IFI de <i>T. gondii</i> , segundo as recomendações do fabricante .....	130

H. Protocolo realizado para o teste de IMR de <i>D. immitis</i> , segundo as recomendações do fabricante .....	131
I. Presença de lobo por UTM 10x10 km, alcateias detectadas, área de distribuição (presença regular) e de presença irregular estimadas, e núcleos populacionais identificados .....	132
J. Sobreposição da área de distribuição do lobo e das alcateias detectadas com o mapa da temperatura média anual .....	133

## Lista de Figuras

1. Mapa com os concelhos de origem dos animais que ingressaram no CRFS, durante o estágio .....	4
2. Ciclo de vida de um ixodídeos com 3 hospedeiros .....	9
3. Mórula de <i>E. canis</i> em esfregaço sanguíneo de medula óssea de um cão infectado naturalmente .....	24
4. Mapa da incidência mundial das 4 subespécies de <i>F. tularensis</i> .....	32
5. Mapa da prevalência de infecção por <i>L. infantum</i> em Portugal .....	56
6. Ciclo de vida de <i>T. gondii</i> .....	67
7. Testes comerciais de IFI, para detecção de anticorpos específicos contra <i>L. infantum</i> , <i>B. canis</i> e <i>T. gondii</i> .....	76
8. Placa com diluições de várias amostras .....	76
9. Lavagem das lâminas em água destilada .....	77
10. Lâminas com conjugado em cada poço .....	77
11. Teste de aglutinação em placa para detecção de anticorpos contra <i>F. tularensis</i> .....	78
12. Testes de IMR para detectar antigénios de <i>D. immitis</i> .....	78
13. Cadáver de raposa, antes da sua necropsia .....	78
14. Origem geográfica dos lobos e raposas estudados, por distritos .....	82
15. Mapas com as origens geográficas dos canídeos em geral e por espécie, por concelhos .....	83
16. Imagens de microscopia obtidas através de IFI de <i>L. infantum</i> , <i>B. canis</i> e <i>A. phagocytophilum</i> .....	85
17. Placa de aglutinação para diluições 1:20 em amostras de canídeos .....	87
18. Testes de IMR realizados em LTE de <i>C. lupus</i> , com resultados negativos .....	87
19. Lobo juvenil antes da necropsia .....	87
20. Mapas com os concelhos de origem dos canídeos que revelaram anticorpos específicos, e segundo a espécie .....	91
21. Distribuição por concelhos dos agentes patogénicos detectados no rastreio sorológico .....	94

## Lista de Gráficos

1. Distribuição da frequência relativa, por grupos de espécies, dos animais que entraram no CRFS, durante o estágio .....	4
2. Distribuição das frequências relativas das causas de ingresso, durante o estágio .....	5
3. Destino dos animais que ingressaram no CRFS, durante o estágio .....	5
4. Distribuição das frequências relativas das causas de morte identificadas nas necropsias .....	7
5. Número de lobos e raposas avaliados .....	80

6. Número de animais recolhidos ao longo do tempo.....	80
7. Distribuição dos canídeos, de acordo com os distritos de origem .....	82
8. Número de fêmeas e machos de cada espécie.....	83
9. Número de canídeos, segundo o grupo etário a que pertencem .....	84
10. Estado de conservação do total das amostras, em percentagem.....	84
11. Estado de conservação das amostras, em cada espécie .....	85
12. Prevalências de anticorpos para agentes transmitidos por vectores e contra <i>T. gondii</i> , observadas nos canídeos analisados .....	89
13. Distribuição de prevalências de anticorpos para os agentes patogénicos estudados, de acordo com a espécie de canídeo.....	90
14. Distribuição do número de amostras positivas para a presença de anticorpos específicos, de acordo com o ano de recolha .....	91

## Lista de Tabelas

1. Distribuição do número de espécies que ingressaram no CRFS, durante o estágio.....	4
2. Distribuição do número de espécies que se encontravam em processo de recuperação no CRFS .....	6
3. Distribuição do número de espécies necropsiadas durante o estágio no CRFS .....	6
4. Distribuição, vectores e relevância clínica de algumas espécies de <i>B. burgdorferi</i> s.l....	16
5. Antibióticos recomendados para o tratamento da tularémia canina.....	41
6. Prevalências de dirofilariose em canídeos e humanos em países do sul da Europa .....	43
7. Principais adulticidas e microfilaricidas usados no tratamento da dirofilariose canina ....	47
8. Quimioprolípticos recomendados na prevenção da dirofilariose canina .....	48
9. Situação da leishmaniose canina em países endémicos da Europa .....	55
10. Prevalências de infecção por <i>T. gondii</i> em diferentes espécies, em diversas regiões ..	69
11. Diluições das amostras analisadas para cada agente etiológico e respectivos valores dos limiares de positividade ( <i>cut-off</i> ) aplicados .....	77
12. Número de amostras colhidas de cada espécie e frequências relativas no conjunto total.....	80
13. Número de canídeos recolhidos por cada ano .....	80
14. Distribuição do número de lobos e raposas recolhidos por distrito e concelhos respectivos.....	81
15. Distribuição das frequências absolutas e relativas dos resultados obtidos por IFI para cada agente etiológico .....	86
16. Títulos finais de anticorpos obtidos para cada agente patogénico, segundo a espécie de canídeo .....	86
17. Registos das necrópsias de canídeos, colheita de amostras e causas de morte .....	88
18. Tabela de dupla entrada com as espécies de canídeos estudadas e a presença ou não de resultados positivos na sorologia .....	89
19. Tabela de dupla entrada com o tipo de amostras analisadas e a observação ou não de resultados positivos.....	90
20. Tabela de dupla entrada com a relação entre o sexo dos animais e a observação ou não de resultados positivos.....	92
21. Tabela com a relação entre o sexo dos canídeos e a observação ou não de resultados positivos, de acordo com a espécie .....	92
22. Tabela com a relação entre a idade dos animais e a observação ou não de resultados positivos .....	93
23. Tabela com a relação entre a idade dos lobos e a observação ou não de resultados positivos.....	93
24. Tabela com a relação entre o estado de conservação das amostras e a identificação ou não de anticorpos específicos.....	93

25. Tabela de dupla entrada com a relação entre a presença de outros parasitas (encontrados nas necrópsias) e a observação ou não de anticorpos para os agentes em estudo.....	94
26. Tabela com a relação entre a espécie, o sexo e a idade dos canídeos, e a observação ou não de anticorpos para <i>R. conorii</i> .....	95
27. Relação entre o sexo e a idade dos lobos, e observação ou não de anticorpos contra <i>R. conorii</i> .....	95
28. Tabela com a relação entre o sexo das raposas e a observação ou não de anticorpos contra <i>R. conorii</i> .....	95
29. Tabela com os agentes etiológicos detectados no rastreo sorológico realizado nos canídeos silvestres .....	96

## Lista de Abreviaturas e Siglas

<b>AC</b>	– Absorção cruzada
<b>Ac</b>	- Anticorpo
<b>ACA</b>	– Acrodermatite crónica atrófica
<b>AD</b>	– Aglutinação directa
<b>ADN</b>	– Ácido desoxirribonucleico
<b>Ag</b>	– Antigénio
<b>AGC</b>	– Anaplasmosse granulocítica canina
<b>ANA</b>	– Anticorpos anti-nucleares
<b>AP</b>	– Aglutinação em placa
<b>ARN</b>	– Ácido ribonucleico
<b>ARNr</b>	- Ácido ribonucleico ribossomal
<b>BID</b>	– cada 12 horas
<b>BL</b>	– Borreliose de Lyme
<b>BSK II</b>	– Meio de cultura Barbour-Stoenner-Kelly II
<b>BSL-3</b>	– <i>Bio Safety Level 3</i>
<b>CDC</b>	– <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
<b>CEVDI</b>	– Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas Dr. Francisco Cambournac
<b>CID</b>	– Coagulação intravascular disseminada
<b>CRFS</b>	– Centro de Recuperação de Fauna Selvagem
<b>DDT</b>	– Ditiotretol
<b>DT</b>	– <i>Dye test Sabin-Feldman</i>
<b>ECG</b>	– Electrocardiograma
<b>EDTA</b>	– Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>ELISA</b>	– <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>EM</b>	– Eritema <i>migrans</i>
<b>EMC</b>	– Erliquiose monocítica canina
<b>EUA</b>	– Estados Unidos da América
<b>FBC</b>	– Febre botonosa canina
<b>GB</b>	– Grã-Bretanha
<b>HAI</b>	– Hemaglutinação indirecta
<b>IB</b>	– <i>Immuno blot</i>
<b>IC</b>	– Imunocromatografia
<b>ICR</b>	– Imunocromatografia rápida
<b>IFI</b>	– Imunofluorescência indirecta
<b>Ig</b>	– Imunoglobulina
<b>IM</b>	– Intramuscular
<b>IMR</b>	– Imunomigração rápida
<b>IUCN</b>	– <i>International Union for Conservation of Nature</i>
<b>IV</b>	– Intravenosa

**L3** – larva de 3º estágio  
**LBA** – Lavagem bronco-alveolar  
**LCan** – Leishmaniose canina  
**LCR** – Líquido cefalorraquidiano  
**LTE** – *Lung tissue extract*  
**MIF** - Microimunofluorescência  
**Nº** – número  
**NZ** – Nova Zelândia  
**PBG** – Parque Biológico de Gaia  
**PBS** – Tampão fosfato-salino  
**PCR** – *Polymerase chain reaction*  
**PNNT** – *Plaque reduction neutralization test*  
**PNPG** – Parque Nacional da Peneda-Gerês  
**PNRF** – Parque Natural da Ria Formosa  
**PO** – *Per os* (via oral)  
**RT-PCR** – técnica de PCR- transcriptase reversa  
**RU** – Reino Unido  
**s.l.** – sensu lato  
**s.s.** – sensu stricto  
**SC** – Subcutânea  
**SID** – cada 24 horas  
**SIDA** – Síndrome de imunodeficiência adquirida  
**TEP** – Tromboembolismo pulmonar  
**TID** – cada 8 horas  
**TOSV** – Vírus Toscana  
**TSL-PAMFRI** – *Toxoplasma Serology Laboratory* – Palo Alto Medical Foundation Research Institute  
**vs.** - *versus*  
**WB** – *Western blot*

---

## Lista de Símbolos

% – percentagem  
 $\chi^2$  – Qui-quadrado  
® – marca registada  
**g** – grama  
**h** – horas  
**kDa** – quiloDalton  
**kg** – quilograma  
**mg** – micrograma  
**mL** – mililitro  
**n** – frequência absoluta  
°C – grau Célsius  
**p** – probabilidade  
<sup>TM</sup> – *Trademark*  
**µL** – microlitro  
**µm** – micrómetro

## **Capítulo I. Introdução**

Ao longo da história, a fauna silvestre tem constituído uma fonte importante de doenças infecciosas transmissíveis ao Homem e a outros animais. Actualmente, as zoonoses associadas a hospedeiros reservatórios de origem silvestre representam um desafio relevante para a Saúde Pública, a nível mundial. A importância dessas zoonoses tem tido um reconhecimento crescente por parte da comunidade científica e das autoridades de saúde, pelo que se torna necessário saber mais sobre este tópico, de modo a compreender melhor o impacto que as doenças zoonóticas têm nas vidas das populações humanas e animais (Kruse, Kirkemo & Handeland, 2004).

Aproximadamente 60% dos agentes patogénicos para humanos têm carácter zoonótico, por isso, não é surpreendente que muitas das doenças emergentes ou reemergentes sejam provenientes de animais. Cerca de 75% das doenças que surgiram nas duas últimas décadas têm origem na fauna silvestre (Bengis et al., 2004). As zoonoses têm demonstrado um impacto substancial não só na saúde humana e animal, mas também na produção agrícola e pecuária, e nas economias relacionadas com a vida silvestre e a sua conservação.

A emergência dos agentes patogénicos está associada a uma série de factores, a maioria deles relacionados com o rápido e exponencial crescimento da actividade humana global. De entre esses factores, destacam-se o aumento da densidade populacional humana, a elevada frequência e facilidade de mobilidade a nível local e internacional, quer de pessoas quer de animais (ou produtos animais), a modificação dos sistemas agrícolas que favorecem a disseminação de agentes entre populações silvestres e domésticas, assim como um conjunto de alterações climáticas e ambientais que têm produzido efeitos sobre a distribuição de hospedeiros selvagens e vectores, contribuindo assim para a propagação de inúmeras zoonoses (Bengis et al., 2004).

A transmissão de algumas doenças está associada a vectores artrópodes, como carraças, mosquitos, flebotomos e tabanídeos. Geralmente, são estes vectores que estabelecem a ponte entre o ciclo silvático da doença e o ciclo doméstico, facilitando a transmissão dos agentes patogénicos aos hospedeiros definitivos. A ocorrência destas doenças está, portanto, intimamente ligada à existência de vectores e hospedeiros reservatórios em determinadas regiões. Assim, as doenças associadas a vectores tendem a surgir em áreas geográficas com características ambientais e faunísticas favoráveis à interacção dessas espécies (vector, hospedeiro reservatório e hospedeiro definitivo).

Portugal, por se situar na região da bacia Mediterrânica, possui condições ambientais e uma localização geográfica propícia ao aparecimento de numerosos vectores, relacionados com a transmissão de agentes patogénicos de grande relevância clínica e epidemiológica, como as anaplasmoses, borrelioses, erliquioses, riquetsioses, tularémia, dirofilarioses, babesioses, leishmanioses e arboviroses.

A oportunidade de investigar a ocorrência de doenças, na maioria zoonoses, com um padrão emergente no nosso país, em particular, e na região Mediterrânica, em geral, surgiu como um tema de interesse pessoal, mas também pela importância epidemiológica que estas doenças têm vindo a ganhar nos últimos tempos. Por outro lado, a área de estudo deste trabalho, a região Norte de Portugal, apresenta várias características que podem sugerir, à partida, uma interacção epidemiológica interessante entre a fauna silvestre, os animais domésticos e as populações humanas, pela proximidade de contacto entre elas. É de notar também, que as espécies-alvo deste estudo sorológico, o lobo ibérico (*Canis lupus signatus* Cabrera, 1907) e a raposa vermelha (*Vulpes vulpes silacea* Miller, 1907), representam canídeos silvestres com reconhecido contributo para o equilíbrio ecológico dos *habitats*, por constituírem provavelmente os maiores predadores carnívoros silvestres em Portugal. Adicionalmente, o lobo ibérico está classificado como uma espécie Em Perigo de extinção em Portugal (EN, segundo o sistema de avaliação e classificação da IUCN, Cabral et al., 2006), pelo que importa conhecer os principais agentes patogénicos que circulam no seu *habitat* natural e o impacto que podem reproduzir na conservação desta espécie protegida.

Por conseguinte, esta dissertação pretende introduzir uma perspectiva geral sobre algumas doenças dos canídeos associadas a vectores, nomeadamente a referência à sua etiologia e epidemiologia, bem como as características clínicas que apresentam e as medidas de controlo existentes. Paralelamente, será abordada também outra zoonose com importância em Saúde Pública, a toxoplasmose.

Após essa breve revisão bibliográfica, será apresentado o estudo sorológico efectuado nos canídeos silvestres do Norte de Portugal, com respeito à metodologia usada, resultados obtidos e, por fim, a elaboração da discussão sobre as evidências observadas e direcções futuras.

## Capítulo II. Actividades desenvolvidas durante o estágio curricular

A elaboração desta dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária resulta do estágio curricular realizado no Centro de Recuperação de Fauna Selvagem (CRFS) do Parque Nacional da Peneda-Gerês (PNPG), em colaboração com os Laboratórios de Parasitologia da FMV/UTL e do Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas Dr. Francisco Cambournac (CEVDI). O estágio foi efectuado sob a orientação do Médico Veterinário do CRFS-PNPG e teve a duração de aproximadamente 8 meses, distribuídos pelos vários locais de estágio. Durante esse período de tempo foi possível adquirir novas aptidões práticas e desenvolver alguns conhecimentos prévios, que contribuíram para um interesse renovado pela área da Sanidade Animal, particularmente aplicada à fauna silvestre.

### 1. Parque Nacional da Peneda-Gerês

O PNPG foi criado em 1971 (Decreto-Lei nº 187/71, de 8 de Maio) e constitui a única Área Protegida de Portugal que beneficia do estatuto de Parque Nacional<sup>1</sup>. O CRFS aí instalado desde 1987, permite receber animais que careçam de cuidados médicos e possui as instalações necessárias ao seu acolhimento, tratamento e recuperação, até que estejam aptos para serem libertados de volta ao seu *habitat* natural.

O estágio no CRFS-PNPG decorreu desde 7 de Outubro a 19 de Dezembro de 2008, período durante o qual foi possível acompanhar o Médico Veterinário responsável pelo centro, em diversas actividades relacionadas com a recuperação de espécies silvestres (Anexo A), numa vertente clínica, e a monitorização das principais ameaças e riscos associados à mortalidade da fauna silvestre (pela realização de necrópsias e exames complementares). Adicionalmente, foi possível participar noutro tipo de serviços veterinários, como o apoio ao programa de indemnização dos prejuízos atribuídos ao lobo.

O CRFS recebe animais da área delimitada pelo PNPG, mas também de toda a região do norte de Portugal, bem como de outros centros e instituições ligados à conservação das espécies silvestres em todo o território nacional. Durante o período de estágio, deram entrada no CRFS 27 animais de 10 espécies diferentes (Tabela 1). A Classe mais representada foi a das aves (96,3%, 9 espécies), predominantemente pelas aves de rapina diurnas (66,7%, 5 espécies), seguidas das rapinas nocturnas (25,9%, 3 espécies) e dos passeriformes (3,7%, 1 espécie). Os mamíferos constituíram apenas 3,7% dos ingressos, representados por um único carnívoro (Gráfico 1). Segundo o Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal (Cabral et al., 2006), a maioria das espécies recebidas têm estatuto de Pouco Preocupante (66,7%), 11,1% de Quase Ameaçado, 22,2% de Vulnerável e 11,1% de Informação Insuficiente.

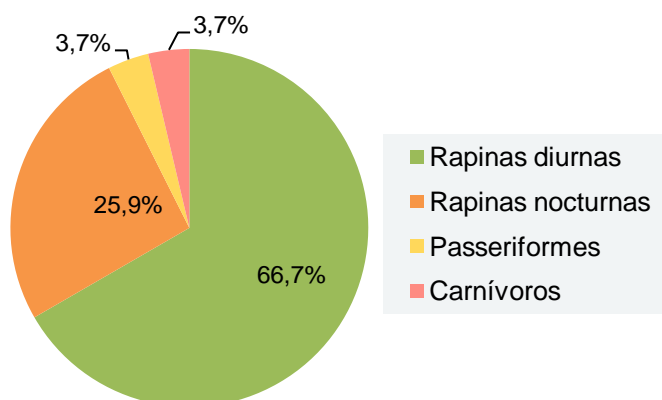
---

<sup>1</sup> "Área com ecossistemas pouco alterados pelo homem, amostras de regiões naturais características, paisagens naturais ou humanizadas, locais geomorfológicos ou habitats de espécies com interesse ecológico, científico e educacional." (ICNB, 2005)

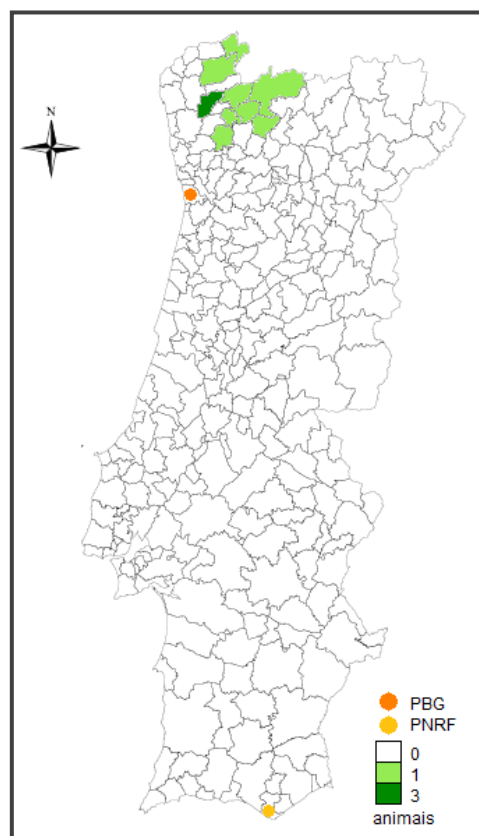


**Tabela 1** – Distribuição do número de espécies que ingressaram no CRFS, durante o estágio.

Espécie	Nome comum	Nº de ingressos	Estatuto
<i>Accipiter gentilis</i>	Açor	2	Vulnerável
<i>Accipiter nisus</i>	Gavião	4	Pouco Preocupante
<i>Asio otus</i>	Bufo-pequeno	1	Informação Insuficiente
<i>Buteo buteo</i>	Águia-d'asa-redonda	9	Pouco Preocupante
<i>Falco subbuteo</i>	Ógea	1	Vulnerável
<i>Gyps fulvus</i>	Grifo	2	Quase Ameaçado
<i>Strix aluco</i>	Coruja-do-mato	1	Pouco Preocupante
<i>Turdus philomelos</i>	Tordo-pinto	1	Pouco Preocupante
<i>Tyto alba</i>	Coruja-das-torres	5	Pouco Preocupante
<i>Vulpes vulpes</i>	Raposa	1	Pouco Preocupante
<b>Total</b>		<b>27</b>	

**Gráfico 1** – Distribuição da frequência relativa, por grupos de espécies, dos animais que entraram no CRFS, durante o estágio.

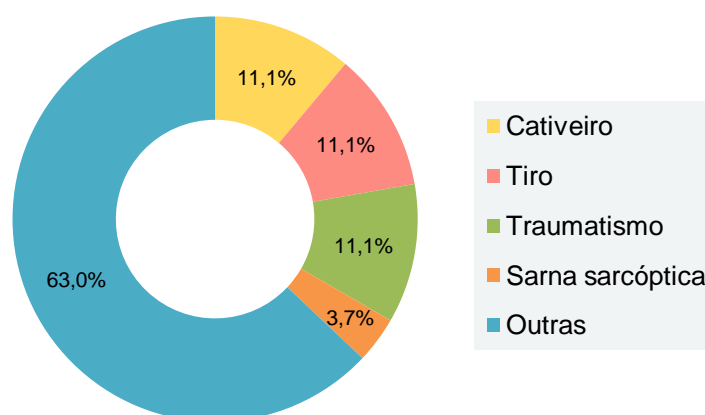
Os animais recebidos no CRFS tiveram origem em 9 concelhos, maioritariamente do noroeste de Portugal (Figura 1), nomeadamente, Arcos de Valdevez ( $n=1$ ), Cabeceiras de Basto ( $n=1$ ), Guimarães ( $n=1$ ), Melgaço ( $n=1$ ), Montalegre ( $n=1$ ), Póvoa de Lanhoso ( $n=1$ ), Terras de Bouro ( $n=1$ ), Vieira do Minho ( $n=1$ ) e Vila Verde ( $n=3$ ). Adicionalmente, ingressaram no centro 12 animais transferidos do Parque Biológico de Gaia (PBG) e 2 do Parque Natural da Ria Formosa (PNRF). Não foi possível determinar a origem de 2 animais. Em relação às datas de ingresso, o mês de Novembro foi o que demonstrou maior número de entradas ( $n=21$ ), e nos meses de Outubro e Dezembro registaram-se apenas 3 ingressos, respectivamente. As causas de ingresso foram variadas, como o cativeiro ( $n=3$ ), traumatismos ( $n=3$ ), tiro ( $n=3$ ) e outras causas ( $n=17$ ), que incluem colisões e acidentes

**Figura 1** – Mapa com os concelhos de origem dos animais que ingressaram no CRFS, durante o estágio.

vários, além de traumatismos de origem desconhecida, bem como a sarna sarcóptica ( $n=1$ ) (Gráfico 2).

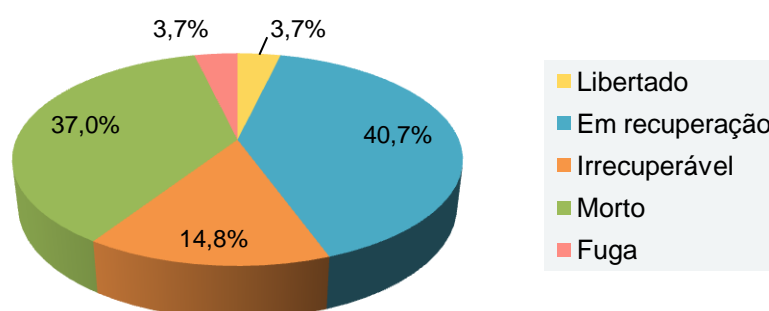
Apesar do período de estágio ter coincidido com o início da época geral de caça, não se observaram muitos ingressos com traumatismos por tiro. Em compensação, o final de Outono/início de Inverno de 2008 foi bastante rigoroso no PNPG, em termos de condições climáticas, o que pode justificar a entrada de muitos animais sem causa aparente de doença ou traumatismos, mas com uma condição corporal menos boa ou mesmo de caquexia, pela falta de alimento disponível.

**Gráfico 2** – Distribuição das frequências relativas das causas de ingresso, durante o estágio.



Dos animais que deram entrada durante o estágio, um foi libertado, outro fugiu das instalações, 4 foram dados como irrecuperáveis e 10 morreram, dos quais 8 sucumbiram no seguimento das lesões que apresentavam, um foi submetido a eutanásia e outro morreu na sequência de canibalismo intra-específico. Os restantes 11 animais encontravam-se em processo de recuperação nas instalações do CRFS-PNPG (Gráfico 3).

**Gráfico 3** – Destino dos animais que ingressaram no CRFS, durante o estágio.



Para além dos animais recebidos durante os meses de estágio, encontravam-se já nas instalações do centro 15 espécies em recuperação, enumeradas na Tabela 2. Desses animais, a classe mais representada foi também a das aves (98,6%), principalmente as rapina diurnas ( $n=48$ ), as rapinas nocturnas ( $n=14$ ), os passeriformes ( $n=9$ ), e outras aves ( $n=3$ ). Apenas um mamífero quiróptero estava em processo de recuperação.

**Tabela 2** – Distribuição do número de espécies que se encontravam em processo de recuperação no CRFS.

<b>Espécie</b>	<b>Nome comum</b>	<b>Nº de animais</b>
<i>Accipiter gentilis</i>	Açor	10
<i>Accipiter nisus</i>	Gavião	3
<i>Bubo bubo</i>	Bufo-real	3
<i>Buteo buteo</i>	Águia-d'asa-redonda	31
<i>Caprimulgus europaeus</i>	Noitibó-cinzento	1
<i>Ciconia ciconia</i>	Cegonha-branca	1
<i>Corvus corax</i>	Corvo	3
<i>Corvus corone</i>	Gralha-preta	6
<i>Falco subbuteo</i>	Ógea	1
<i>Gyps fulvus</i>	Grifo	1
<i>Larus spp.</i>	“gaivota”	1
<i>Milvus migrans</i>	Milhafre-preto	1
<i>Milvus milvus</i>	Milhafre-real	1
<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	Morcego-anão	1
<i>Strix aluco</i>	Coruja-do-mato	3
<i>Tyto alba</i>	Coruja-das-torres	8
<b>Total</b>		<b>75</b>

Desses animais, um foi transferido para outra instituição (1,3%), 9 foram libertados (12,0%), 11 morreram (14,7%) e 54 permaneceram em recuperação no CRFS-PNPG (72,0%), durante o período de tempo do estágio.

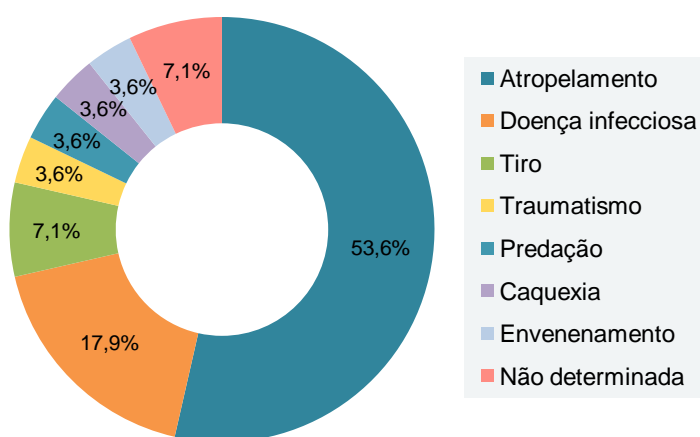
Realizaram-se 28 necrópsias de 13 espécies diferentes, referidas na Tabela 3. Geralmente as necrópsias são efectuadas regularmente, de modo a determinar, a curto/médio prazo, as causas de morte dos animais acolhidos pelo centro, no entanto, durante o estágio procedeu-se à necrópsia de animais seleccionados de acordo com os interesses inerentes aos temas de Mestrado dos estagiários presentes.

**Tabela 3** – Distribuição do número de espécies submetidas a necrópsia durante o estágio no CRFS.

<b>Espécie</b>	<b>Nome comum</b>	<b>Nº de necrópsias</b>
<i>Accipiter nisus</i>	Gavião	1
<i>Asio otus</i>	Bufo-pequeno	1
<i>Canis lupus</i>	Lobo	3
<i>Capreolus capreolus</i>	Corço	1
<i>Crocidura russula</i>	Musaranho-de-dentes-brancos	1
<i>Genetta genetta</i>	Geneta	3
<i>Gyps fulvus</i>	Grifo	1
<i>Lutra lutra</i>	Lontra	1
<i>Martes foina</i>	Fuinha	3
<i>Martes martes</i>	Marta	1
<i>Meles meles</i>	Texugo	2
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Coelho-bravo	1
<i>Vulpes vulpes</i>	Raposa	9
<b>Total</b>		<b>28</b>

Assim, os mamíferos em geral representaram a classe mais frequente ( $n=25$ ), uma vez que se pretendia recolher amostras de tecidos para pesquisa de *Trichinella* sp. e *Sarcoptes* sp. e várias viroses, por outro lado, as raposas e os lobos mereceram especial atenção pelo facto de constituírem as espécies-alvo da corrente dissertação, e do estudo de prevalências de parasitas gastro-intestinais realizado por outro estagiário. Adicionalmente, foram ainda necropsiadas 3 aves. Relativamente às causas de morte, a maioria resultou de atropelamentos ( $n=15$ ), seguidos das doenças infecciosas ( $n=5$ ), tiro ( $n=2$ ), traumatismo de origem desconhecida ( $n=1$ ), predação ( $n=1$ ), caquexia ( $n=1$ ), envenenamento ( $n=1$ ), e em 2 animais não foi possível determinar a causa de morte (Gráfico 4).

**Gráfico 4** – Distribuição das frequências relativas das causas de morte identificadas nas necrópsias.



Desde que foi publicada a Lei nº 90/88 (Lei de Protecção ao Lobo-ibérico), de 13 de Agosto, e a respectiva regulamentação (Decreto-Lei nº 139/90, de 27 de Abril), o Estado português assumiu a responsabilidade de indemnizar os proprietários pelos prejuízos atribuídos ao lobo, de acordo com determinados critérios de protecção dos efectivos pecuários. Neste âmbito, o ICNB implementou um sistema de verificação e avaliação dos ataques aos animais de interesse pecuário participados pelos criadores, atribuindo posteriormente as respectivas indemnizações. Deste modo, foi possível acompanhar o Médico Veterinário nas visitas de avaliação a 8 explorações pecuárias (incluindo efectivos caprinos, ovinos e bovinos) que sofreram ataques causados pelo lobo, cujas localizações abrangeram os concelhos de Arcos de Valdevez ( $n=2$ ), Melgaço ( $n=1$ ), Montalegre ( $n=3$ ) e Terras de Bouro ( $n=2$ ). Pensa-se que estes ataques resultem do declínio das populações de presas silvestres, provocado essencialmente pela acção do Homem ao longo do tempo, que forçou os lobos a depender dos ungulados domésticos para se alimentar, originando assim prejuízos na pecuária por toda a sua área de distribuição (Pimenta et al, 2005).

Para além das tarefas diárias efectuadas no CRFS-PNPG, grande parte do tempo dispendido foi ocupado com trabalho de campo, designadamente, percursos pedestres e trajectos com veículo apropriado ao terreno acidentado. Estes percursos foram realizados

com o objectivo de recolher o maior número de amostras possíveis, dentro do tempo de estágio disponível, de dejectos de lobo, raposa e cão (doméstico) para análises coprológicas de Parasitologia. Toda a área geográfica do PNPG foi abrangida, incluindo zonas exteriores ao mesmo (Anexo B), tendo sido recolhidas 315 amostras, na sua maioria de lobo ( $\approx 57\%$ ), raposa ( $\approx 28\%$ ), cão ( $\approx 12\%$ ) e cerca de 3% cuja espécie não foi identificada. As amostras foram armazenadas em sacos de plástico, devidamente identificadas e refrigeradas a 4-5°C, para seguirem para o laboratório de Parasitologia da FMV, onde foram analisadas.

Adicionalmente, foi possível participar num rastreio de Tricomoníase em pombos-das-rochas (*Columba livia*), no âmbito de um projecto de conservação da águia de Bonelli (*Hieraaetus fasciatus*), cujo estatuto está definido como Em Perigo de extinção (Cabral et al, 2006). Este rastreio foi realizado em pombais localizados na área do Parque Natural do Douro Internacional (distritos de Bragança e da Guarda), em colaboração com outros colegas ligados à conservação de *habitats* e espécies selvagens. Cerca de 10% dos indivíduos de cada pombal foi sujeito a zaragatoa orofaríngea, armazenando-se cada amostra em meio de cultura adequado, à temperatura ambiente, para ser observada ao microscópio óptico.

## **2. Laboratório de Doenças Parasitárias da FMV**

O estágio neste laboratório decorreu desde 5 de Janeiro a 7 de Julho de 2009, tendo sofrido uma interrupção durante os meses de Abril e Maio. Desenvolveram-se várias actividades, nomeadamente a análise coprológica das amostras de dejectos colhidas previamente no PNPG, as quais foram submetidas aos métodos qualitativos de flutuação e sedimentação, bem como a técnica quantitativa de McMaster. Procedeu-se também à análise sorológica de 90 amostras recolhidas a partir de lobos e raposas, no âmbito do tema da corrente dissertação, tendo sido realizados os testes de imunofluorescência indirecta (IFI) para detectar anticorpos específicos para *Babesia canis*, *Leishmania infantum* e *Toxoplasma gondii*, assim como o teste de imunomigração rápida para detectar antígenos de *Dirofilaria immitis*. Adicionalmente, pesquisou-se a presença de *Trichinella sp.* pela técnica de digestão pela pepsina, em amostras de músculo e língua recolhidas durante as necrópsias de carnívoros. Tanto a coprologia como a pesquisa de triquinela constituíram matéria de discussão do trabalho de outro colega, pelo que não serão desenvolvidos nesta dissertação.

## **3. Laboratórios do CEVDI**

Nestes laboratórios, de 23 a 27 de Maio de 2009, realizaram-se diversos testes de IFI, com o intuito de detectar anticorpos específicos para *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* s.l., *Ehrlichia canis*, *Rickettsia conorii*, *Francisella tularensis* e para o flebovírus Toscana, em 88 amostras retiradas de lobos e raposas. Estes resultados, juntamente com aqueles obtidos na sorologia efectuada no laboratório da FMV, foram analisados estatisticamente no âmbito da presente dissertação, e serão discutidos mais adiante.

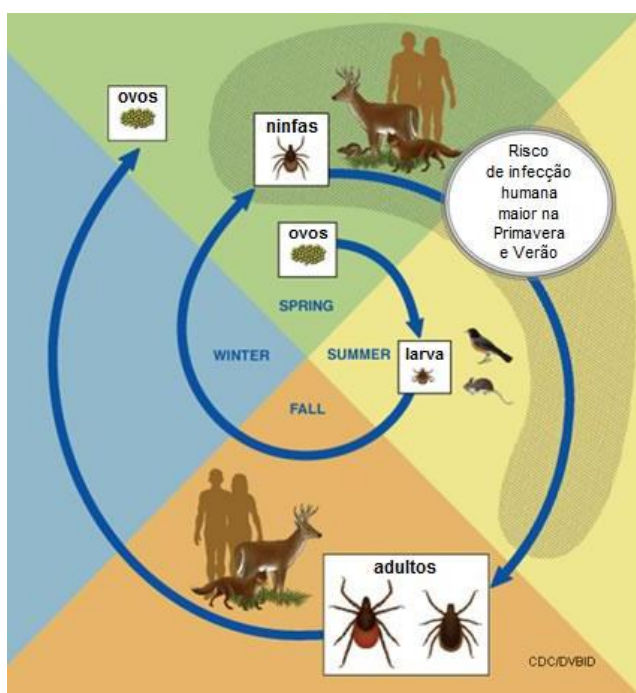
## Capítulo III. Revisão Bibliográfica

### 1. Doenças associadas a vectores

O comportamento hematófago de uma ampla variedade de artrópodes torna-os vectores importantes de doenças infecciosas em canídeos e outros animais selvagens e domésticos, e por vezes, no Homem. Carrapatos, mosquitos, flebótomos e tabanídeos constituem alguns dos grupos de vectores com interesse na transmissão de agentes patogénicos, responsáveis por doenças com impacto em Medicina Veterinária, mas também na Medicina Humana, nomeadamente, as anaplasmoses, borrelioses, erliquioses, riquetsioses, tularémia, dirofilarioses, babesioses, leishmanioses e arboviroses (descritas adiante).

No que respeita às carrapatas, a família Ixodidae é a que apresenta maior relevância médica e epidemiológica, pelo número de espécies implicadas na transmissão de agentes patogénicos, das quais se destacam os géneros *Ixodes*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Rhipicephalus* e *Amblyomma* (Wall & Pitts, 2005). Os ixodídeos apresentam uma distribuição geográfica bastante abrangente, de acordo com os nichos ecológicos dos seus hospedeiros, que incluem mamíferos, aves, répteis e anfíbios.

**Figura 2** – Ciclo de vida de um ixodídeo com 3 hospedeiros (adaptado de CDC/BVID, 2007).



O ciclo de vida dos ixodídeos envolve 4 estágios (ovo, larva, ninfa e adulto) e, para a maioria, viver num ambiente onde existem hospedeiros em quantidade suficiente e *habitats* onde as condições de temperatura e humidade são propícias à sobrevivência nas fases de vida livre, fez com que adoptassem um ciclo de vida de 3 hospedeiros (Figura 2). Nas espécies que vivem em zonas onde a presença de hospedeiros é escassa e as condições ambientais são desfavoráveis ou muito variáveis, os ciclos biológicos normalmente envolvem apenas um ou dois hospedeiros (Wall & Pitts, 2005).

Os mosquitos da família Culicidae estão distribuídos mundialmente, desde os Trópicos até ao Ártico. Dividem-se em várias subfamílias, das quais Anophelinae e Culicinae, que incluem espécies com potencial vectorial, como *Anopheles* spp. (Anophelinae), *Culex* spp. e *Aedes* spp. (Culicinae). Mosquitos diferentes possuem hábitos alimentares distintos, sendo que uns alimentam-se em hospedeiros específicos, enquanto outros são menos discriminativos e fazem a sua refeição em diversos hospedeiros vertebrados. Os mosquitos

podem viver durante longos períodos de tempo e invernar, permitindo a sobrevivência de agentes patogénicos duma estação do ano para outra (Wall & Pitts, 2005).

Os flebótomos pertencem à subfamília Phlebotominae, incluída na família Phlebotomidae. São amplamente distribuídos nos Trópicos, Subtrópicos e na região do Mediterrâneo. Existem 2 géneros com grande importância na transmissão de agentes patogénicos, designadamente, *Phlebotomus* spp. (no Velho Mundo) e *Lutzomyia* spp. (no Novo Mundo) (Wall & Pitts, 2005). A família Tabanidae inclui vários géneros de tabanídeos, que constituem importantes vectores mecânicos de vários microrganismos patogénicos. As espécies mais relevantes são *Tabanus* spp., *Chrysops* spp. e *Haematopota* spp. (Wall & Pitts, 2005).

## 1.1. Doenças causadas por bactérias

### 1.1.1. Anaplasmosse granulocítica canina

#### 1.1.1.1. Etiologia e Epidemiologia

*Anaplasma phagocytophilum* é o agente etiológico da anaplasmosse granulocítica canina (AGC) e afecta principalmente os granulócitos dos canídeos. Até 2001, esta bactéria pertencia à família Ehrlichiaceae, sob a designação de *Ehrlichia phagocytophila*, tendo sido reformulada a taxonomia desse grupo a partir daquela data. Assim, estabeleceu-se uma nova família, Anaplasmataceae, que inclui 4 géneros diferentes, dos quais se destaca *Anaplasma* spp., ao qual pertence a espécie *A. phagocytophilum* (Rymaszewska & Grenda, 2008). Estas bactérias são organismos intracelulares obrigatórios (0,5-1,5 µm), Gram-negativos, que infectam uma variedade de vertebrados domésticos e silvestres, assim como humanos, em diferentes partes do mundo (McQuiston, McCall, & Nicholson, 2003; Harrus, Waner, Bjöersdorff, & Shaw, 2005; Rymaszewska & Grenda, 2008). A transmissão é feita por ixodídeos de vários géneros, nomeadamente *Ixodes* spp., *Dermacentor* spp., *Rhipicephalus* spp. e *Amblyomma* spp., sendo *Ixodes ricinus* o vector mais frequentemente associado à transmissão da doença na Europa (Harrus et al., 2005; Rymaszewska & Grenda, 2008). Este vector também já foi encontrado no Norte de África, enquanto que *R. sanguineus* foi identificado como vector da AGC no sul da Europa e *I. persulcatus* na Europa de leste (Rymaszewska & Grenda, 2008).

A AGC é considerada uma zoonose emergente em muitos países, tendo sido identificada em vários países da Europa, como Espanha (Santos, Santos-Silva, Almeida, Bacellar, & Dumler, 2004; Fuente et al., 2007; Rymaszewska & Grenda, 2008), Portugal, França e Itália (Santos et al., 2004), Alemanha (Santos et al., 2004; Jensen et al., 2007), Áustria (Sréter, Sréter-Lancz, Széll, & Kálmán, 2004; Jensen et al., 2007), Suíça (Jensen et al., 2007; Rymaszewska & Grenda, 2008), Suécia (Santos et al., 2004; Jensen et al., 2007; Rymaszewska & Grenda, 2008), Reino Unido (Santos et al., 2004; Jensen et al., 2007; Rymaszewska & Grenda, 2008), Dinamarca (Harrus et al., 2005; Figueiredo, 2007), Hungria,

Estónia, Polónia (Sréter et al., 2004, Jensen et al., 2007), Eslovénia, Eslováquia, Croácia e Rússia (Sréter et al., 2004). No entanto, a doença tem distribuição mundial, com ocorrências nos EUA (Gabriel, 2006, Rymaszewska & Grenda, 2008), Canadá, Japão, Índia, Rússia, China, Coreia e Tailândia (Rymaszewska & Grenda, 2008).

Na Europa, há ainda diversos relatos de doença por *A. phagocytophilum* noutras espécies de animais domésticos, como gatos (Harrus et al., 2005, Figueiredo, 2007), bovinos, ovinos e equinos, e também em espécies silvestres, nomeadamente roedores, ruminantes (McQuiston et al., 2003, Harrus et al., 2005, Figueiredo, 2007) e mesmo aves (Figueiredo, 2007), o que pode ser justificado, em parte, pelo facto de *I. ricinus* parasitar um vasto número de hospedeiros vertebrados. Nos ruminantes domésticos, a doença pode ter consequências económicas importantes, devido à ocorrência de abortos, perda de peso e redução da produção de leite, ou em casos mais extremos, pode levar à morte dos animais (Rymaszewska & Grenda, 2008). Nas espécies silvestres, foram registadas prevalências elevadas de infecção por *A. phagocytophilum*, nomeadamente no corço (82% no ELISA, 29% na IFI e 18% no PCR) (Fuente et al., 2007), raposa cinzenta (*Urocyon cinereoargenteus*, 52% na IFI), coiote (*Canis latrans*, 39,5-46%) (Foley, Queen, Sacks, & Foley, 2005, Gabriel, 2006) e urso negro (*Ursus americanus*, 93%) (Gabriel, 2006). Gabriel (2006) considera que a elevada seroprevalência observada nos carnívoros silvestres, com resultados negativos na análise de ADN (PCR), pode ser sugestiva da qualidade desses animais como sentinelas da anaplasmoze granulocítica, em vez de verdadeiros reservatórios. O mesmo autor acrescenta ainda que a ampla área territorial dessas espécies, associada à esperança média de vida relativamente longa, permite uma maior e mais prolongada exposição a potenciais vectores da doença. Por essas razões, e pela maior proximidade a populações humanas e de canídeos domésticos, o autor sugere que também as raposas podem ser bons sentinelas, para além de constituírem um risco zoonótico (Gabriel, 2006).

O comportamento hematófago de *I. ricinus* permite a transmissão de *A. phagocytophilum* a uma grande variedade de vertebrados, incluindo humanos. Contudo, têm sido reportados relativamente poucos casos de anaplasmoze granulocítica humana, na Europa (Eslovénia e Polónia) (Rymaszewska & Grenda, 2008), e geralmente a infecção é ligeira e auto-limitante (Harrus et al., 2005).

Em Portugal, o agente já foi identificado em humanos (anaplasmoze granulocítica humana) (Santos, Bacellar & Dumler, 2006) e, num estudo sorológico e molecular, foi possível verificar a infecção por *A. phagocytophilum* em 54,5% dos cães domésticos analisados (Santos, Alexandre & Sousa, 2009). Adicionalmente, um estudo (Santos et al., 2004) realizado com ixodídeos, revelou a presença de *A. phagocytophilum* em *I. ricinus* (4%) com origem na ilha da Madeira e em *I. ventralis* no continente (2%), mas a prevalência nas carraças *I. ricinus* colhidas no continente foi nula. Contudo, capacidade vectorial de *I.*



*ventalloi* ainda não foi comprovada. Em alguns países da Europa, a prevalência de *I. ricinus* infectados com *A. phagocytophilum* varia entre menos de 1% a 29% (Santos et al., 2004).

A bactéria passa parte do seu ciclo de vida no vector, sendo transmitida transtadialmente. Pensa-se que a transmissão do vector para o hospedeiro vertebrado ocorra em apenas 40 a 48 horas, durante a hematofagia. *A. phagocytophilum* é injectado na corrente sanguínea do hospedeiro, ocupando o citoplasma dos granulócitos, onde se replica por divisão binária, formando grandes corpos de inclusão, as mórulas. Nos animais que não recebem tratamento, as mórulas podem ser observadas nos neutrófilos durante uma a 2 semanas (Harrus et al., 2005).

O agente etiológico também pode ser transmitido através da transfusão de sangue, aliás, foi descrito um caso de infecção numa pessoa por esta via. A transmissão perinatal também pode ocorrer, apesar de ser rara (McQuiston et al., 2003).

#### **1.1.1.2. Patogenia e Sintomas**

A patogenia da AGC não está ainda bem esclarecida. As bactérias entram na derme do hospedeiro, por inoculação do vector, e disseminam-se pelos vasos sanguíneos e/ou linfáticos. O agente pode ser observado em granulócitos maduros, predominantemente nos neutrófilos, mas também nos eosinófilos. Os primeiros corpos de inclusão podem ser detectados nos granulócitos, no sangue periférico, 4 a 14 dias após infecção experimental. A presença de *A. phagocytophilum* pode ser verificada em diferentes órgãos, como o baço, fígado e pulmões, embora a infecção localizada também possa ocorrer nos rins e no coração. Pensa-se que a patogenia da AGC não se deva unicamente à presença das bactérias, mas provavelmente também será resultado da resposta inflamatória gerada pelo organismo do próprio hospedeiro. Evidências disso incluem inflamação pulmonar grave, lesões alveolares, e vasculite nas extremidades, em situações em que o agente etiológico parece estar ausente. A infecção pode induzir uma resposta inflamatória exagerada, com síndrome de choque séptico lesões alveolares difusas, originando um síndrome respiratório agudo. Adicionalmente, a função fagocítica dos neutrófilos é comprometida, deixando o hospedeiro mais susceptível a infecções secundárias. Aliás, a co-infecção com outros agentes patogénicos é possível, pois *I. ricinus* é vector de mais agentes patogénicos. Tanto animais como humanos podem ter infecções concomitantes por *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Borrelia* spp., *Babesia* spp., *Rickettsia* spp., *Bartonella* spp. e arbovírus, apresentando quadros clínicos variados. Uma vez que *A. phagocytophilum* e *B. burgdorferi* partilham, em grande escala, os mesmos vectores e hospedeiros-reservatório, é de esperar que as áreas geográficas onde a AGC é endémica coincidam com as regiões onde a borreliose de Lyme é prevalente. De facto, foi provado que ixodídeos co-infectados com estes dois agentes transmitem cada uma das bactérias aos hospedeiros susceptíveis com a mesma eficiência que os vectores infectados com apenas um dos agentes (Harrus et al., 2005).

O espectro de sinais clínicos manifestados por canídeos é vasto, mas geralmente surgem como uma síndrome febril aguda (Harrus et al., 2005). A prevalência da doença tende a aumentar com a idade, com uma aparente predisposição para as raças puras e o sexo feminino. A mobilidade dos animais, entre regiões não endémicas e zonas endémicas, é provavelmente um factor acrescido para o aumento da incidência da AGC e da sua relevância clínica (Figueiredo, 2007).

Após um período de incubação de 4 a 14 dias, dependendo do estado imunitário do hospedeiro e da estirpe bacteriana envolvida, os cães apresentam uma história de letargia e anorexia. Febre, relutância a mover-se e, ocasionalmente, esplenomegália (Harrus et al., 2005), hepatomegália e linfadenomegália (Figueiredo, 2007) são outros sinais demonstrados. Podem surgir sintomas mais localizados, como claudicação (poliartrite), diarreia, convulsões e défices proprioceptivos. Os sinais sistémicos normalmente estão associados a hemorragias, choque e insuficiência multi-sistémica. Durante e após a fase de bacteriémia, a doença caracteriza-se por alterações hematológicas evidentes, como a trombocitopenia e a leucopenia (linfopenia e neutropenia). A primeira é das alterações mais consistentemente observadas nos cães infectados, podendo ser moderada a grave, e persistir durante alguns dias antes de normalizar (Harrus et al., 2005).

#### 1.1.1.3. Diagnóstico

Cães que apresentem sintomatologia febril aguda, numa região endémica de AGC, devem ser suspeitos de infecção por *A. phagocytophilum*, principalmente nas épocas de maior calor (de Abril a Novembro) (Rymaszewska & Grenda, 2008) em que as populações de vectores são mais abundantes. O diagnóstico pode ser complicado, particularmente quando existem infecções concomitantes, pois os sinais clínicos podem ser muito inespecíficos. A observação de esfregaços de sangue, pela coloração de Giemsa, é pouco sensível e nem sempre permite identificar as mórulas nos granulócitos, especialmente se as mesmas existirem em número reduzido (Harrus et al., 2005, Figueiredo, 2007).

Outro método de diagnóstico directo consiste na cultura do agente em linhas celulares (HL60), embora este procedimento exija equipamento especial (Figueiredo, 2007).

Os testes moleculares, como *Polymerase Chain Reaction* (PCR) ou a variante *nested-PCR*, são bastante adequados para a detecção de ADN de *A. phagocytophilum*, pois possuem elevadas sensibilidade e especificidade. O PCR é mais sensível do que a microscopia e permite identificar os agentes na circulação sanguínea por períodos de tempo superiores à mesma. Esta técnica molecular utiliza mais frequentemente os genes *p44* e *msp4* (Figueiredo, 2007) e *msp2* (Santos et al., 2004) para caracterizar a estirpe bacteriana, em amostras de sangue, líquido sinovial, LCR e de tecidos (Harrus et al., 2005). No entanto, e apesar de ser um teste com boa especificidade, a reactividade cruzada com *A. platys* pode ocorrer (Figueiredo, 2007). Dois estudos revelaram pouca sensibilidade do PCR para

identificar ADN bacteriano em amostras com baixa carga parasitária (Fuente et al., 2007, Jensen et al., 2007). Recentemente, foi comprovada a eficácia de utilização de um teste múltiplo de RT-PCR em tempo real na detecção de ADN de *Ehrlichia* spp. e *A. phagocytophilum*, permitindo diferenciar as várias espécies nos casos de co-infecções (Sirigireddy, Mock, & Ganta, 2006).

A sorologia continua a ser o meio de diagnóstico mais utilizado na prática clínica, pela simplicidade e rapidez que demonstra na detecção de anticorpos para *A. phagocytophilum* (IgG e IgM). Os testes de imunofluorescência indirecta (IFI), *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e *Immunoblot* (IB) são os mais aplicados. A demonstração, por IFI, de um incremento de 4 vezes ou mais dos títulos de anticorpos entre duas análises consecutivas (com intervalo de pelo menos 4 semanas) permite estabelecer o diagnóstico de AGC (McQuiston et al., 2003, Harrus et al., 2005, Figueiredo, 2007). A IFI é bastante sensível, mas ainda assim pode originar falsos-negativos numa fase inicial da doença, em que os níveis de anticorpos são baixos. Por outro lado, podem ocorrer falsos-positivos pela reacção cruzada com outras espécies do género *Anaplasma* e de *Ehrlichia* spp.. A técnica de IB pode ser uma vantagem na comprovação dos resultados obtidos na IFI (McQuiston et al., 2003, Figueiredo, 2007). Apesar da ampla utilização dos testes sorológicos, existe ainda falta de padronização das técnicas (Figueiredo, 2007).

#### **1.1.1.4. Tratamento**

Estudos realizados *in vitro* demonstraram que *A. phagocytophilum* é sensível às tetraciclinas, rifampicina, rifabutina e trovafloxacina, e resistente à gentamicina, eritromicina, azitromicina, clindamicina, trimetoprim-sulfametoxazol e a todos os antibióticos que não actuam intracelularmente, como os  $\beta$ -lactâmicos (Harrus et al., 2005).

Contudo, *in vivo* apenas se comprovou a eficácia das tetraciclinas, rifampicina e do cloranfenicol. A doxiciclina (5-10 mg/kg SID, durante 10 a 21 dias) parece ser a mais eficaz no tratamento da AGC nos cães. Casos de doença grave podem necessitar de tratamento mais prolongado. A doxiciclina pode provocar efeitos adversos, principalmente em animais jovens, mas mesmo nestes continua a ser a substância activa de eleição. Os efeitos secundários mais comuns, como as náuseas e vómitos, podem evitados com a administração do fármaco juntamente com a refeição (Harrus et al., 2005).

#### **1.1.1.5. Prevenção**

Até ao momento, não existe vacina para protecção contra a infecção com *A. phagocytophilum*, nem imunoglobulinas para profilaxia após a exposição ao agente. A prevenção da picada pelo vector continua a ser a medida mais fiável, ainda que pouco praticável (Harrus et al., 2005, McQuiston et al., 2003).

## 1.1.2. Borreliose de Lyme canina

### 1.1.2.1. Etiologia e Epidemiologia

As borrelioses são causadas por espiroquetas do Género *Borrelia*, pertencentes à família Spirochaetaceae. A doença de Lyme, ou Borreliose de Lyme (BL), é transmitida por carraças do género *Ixodes* e tem como agente etiológico a *Borrelia burgdorferi* (Aguero-Rosenfeld, Wang, Schwartz & Wormser, 2005, Hovius, 2005). Esta bactéria Gram-negativa de forma helicoidal possui múltiplos endoflagelos, que lhe conferem grande mobilidade. A sua dimensão varia entre 10-30 µm de comprimento e 0,2-0,5 µm de largura. A parede celular é constituída por um grande número de lipoproteínas que assumem um papel importante na patogenia da BL (Aguero-Rosenfeld, 2005).

*B. burgdorferi* sensu lato (s.l.), distribuída mundialmente, inclui onze espécies, das quais cinco (*B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.), *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana* e *B. lusitaniae*) foram identificadas na Europa, três espécies (*B. burgdorferi* s.s., *B. andersonii* e *B. bissettii*) descritas na América do Norte, e outras sete (*B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. turdi* e *B. sinica*) foram reconhecidas em países asiáticos (Aguero-Rosenfeld, 2005). Destas espécies, pelo menos três (*B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* e *B. afzelii*) são patogénicas para humanos e canídeos, na Europa (Aguero-Rosenfeld, 2005, Hovius, 2005). A bactéria é mantida na natureza num ciclo que envolve ixodídeos, como vectores, e mamíferos e aves silvestres, como hospedeiros reservatórios. *B. burgdorferi* é transmitida pelas vias transtadial e transovárica, embora a última seja rara e pouco eficiente (Fritz & Kjemtrup, 2003).

Na Europa, cada genótipo de *B. burgdorferi* está associado a um hospedeiro vertebrado específico. Assim, *B. burgdorferi* s.s. e *B. afzelii* estão relacionados com pequenos roedores e *B. garinii* com aves. As aves assumem um papel importante na disseminação da doença, uma vez que podem introduzir vectores infectados em zonas não endémicas (através de migrações), ou constituir reservatórios para o agente etiológico (Fritz & Kjemtrup, 2003). Cães e gatos domésticos podem infectar-se, mas são hospedeiros acidentais, pelo que não interagem com o ciclo silvático da doença. Os cães já foram usados como sentinelas em estudos sorológicos (Hovius, 2005, Figueiredo, 2007), para detectar a taxa de infecções por *B. burgdorferi* s.l. em vectores e animais silvestres, e também como indicadores do risco de infecção nos humanos (Hovius, 2005).

O risco de infecção por *B. burgdorferi* s.l. correlaciona-se com a oportunidade de um vertebrado ser picado por ixodídeos infectados, estando, por isso, dependente da densidade populacional de vectores numa determinada área geográfica, da proporção de vectores infectados, da duração de exposição aos vectores e da susceptibilidade do próprio hospedeiro vertebrado (Fritz & Kjemtrup, 2003). Na Europa, *Ixodes* spp. podem estar co-infectados com mais do que uma espécie de *Borrelia* spp.. *B. afzelii* aparenta ser a mais prevalente, apesar de *B. valaisiana* ocorrer localmente no Reino Unido (RU) e Irlanda,

enquanto *B. garinii* é encontrada em áreas localizadas da Europa e da Ásia (Tabela 4). No entanto, a população de cães parece ser mais infectada por *B. burgdorferi* s.s. e *B. garinii*, mesmo nas regiões onde os vectores contêm múltiplas espécies de *B. burgdorferi* s.l.. Este fenómeno sugere diferenças no modo de invasão e infecção das espécies e estirpes de espiroquetas no hospedeiro canino, que devem ser melhor investigadas (Hovius, 2005).

**Tabela 4** – Distribuição, vectores e relevância clínica de algumas espécies de *B. burgdorferi* s.l. (adaptado de Hovius, 2005)

<i>Borrelia</i> spp.	Principais vectores	Principais reservatórios	Distribuição	Distribuição		
				BL humana	BL canina	Infecção em canídeos
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	<i>I. ricinus</i> <i>I. scapularis</i> <i>I. pacificus</i>	roedores aves	América do Norte Europa Ocidental		América do Norte, Europa	
<i>B. afzelii</i>	<i>I. ricinus</i> <i>I. persulcatus</i> <i>I. hexagonus</i>	roedores	Eurásia		Europa	
<i>B. garinii</i>	<i>I. ricinus</i> <i>I. persulcatus</i> <i>I. uriae</i>	aves	Eurásia	Europa		Europa, Japão
<i>B. valaisiana</i>	<i>I. ricinus</i> <i>I. columnae</i>	aves	Eurásia	ND	Europa	ND
<i>B. lusitaniae</i>	<i>I. ricinus</i> <i>I. persulcatus</i>	ND	Centro e Sul da Europa		ND	

*B. burgdorferi* s.l. já foi identificada em canídeos na América, Ásia e Europa (Hovius, 2005, Figueiredo, 2007), nomeadamente Bélgica, Holanda, RU, Suécia, Suíça, Bulgária, Espanha e Portugal (Figueiredo, 2007). No noroeste e centro de Espanha, dados sorológicos em canídeos indicam valores de seroprevalência entre 0,6% e 11,6% (Figueiredo, 2007), respectivamente, enquanto que em Portugal variam entre 2,25% (Alexandre, 2006) a 9% (Figueiredo, 2007). *B. lusitaniae* já foi isolada em Portugal continental, embora não haja evidências sobre o seu potencial patogénico nos canídeos (Figueiredo, 2007). Apesar da taxa de incidência de BL em humanos ser baixa (0,10/10<sup>5</sup> pessoas por ano), em Portugal a doença é de declaração obrigatória (Direcção dos Serviços de Epidemiologia e Estatísticas da Saúde (Direcção-Geral da Saúde), 2008).

#### 1.1.2.2. Patogenia e Sintomas

A transmissão de *B. burgdorferi* s.l. ocorre quando uma carraça infectada se alimenta num hospedeiro susceptível. Após a entrada da espiroqueta na corrente sanguínea, esta multiplica-se e dissemina-se pelo organismo do hospedeiro. Em humanos, estão descritos diversos sintomas dermatológicos, neurológicos, cardíacos e músculo-esqueléticos, que variam da Europa para a América do Norte, mas também de região para região dentro da Europa (Aguero-Rosenfeld, 2005). Presume-se que estas diferenças estejam relacionadas com a presença de distintas espécies de *B. burgdorferi* s.l. (Aguero-Rosenfeld, 2005, Hovius, 2005). Várias espécies podem desenvolver infecção persistente sem sintomatologia

evidente, como foi comprovado em ratos, hamsters, cães e, paralelamente, em humanos (Hovius, 2005). Em zonas endémicas, a percentagem de cães domésticos infectados varia bastante, no entanto, nem todos os cães apresentam sinais clínicos da doença, apesar dos mais jovens manifestarem sintomatologia com maior frequência (Fritz & Kjemtrup, 2003, Hovius, 2005). Cães adultos normalmente não desenvolvem doença clínica após uma única exposição a carrças infectadas (Hovius, 2005). Geralmente, 2 a 5 meses após a infecção, os cães apresentam claudicação, frequentemente acompanhada de febre e anorexia. Sinais de artrite são comuns, associados normalmente a uma articulação, o carpo ou o tarso. Uma síndrome renal está descrita, caracterizada histologicamente por glomerulonefrite (Fritz & Kjemtrup, 2003, Hovius, 2005), necrose tubular e inflamação linfoplasmocítica intersticial. De rápida evolução e com consequências, por vezes, fatais, o processo patológico desta síndrome não está ainda esclarecido (Fritz & Kjemtrup, 2003). Outros sintomas relacionados com o sistema nervoso central e com o coração (miocardites) foram também atribuídos à BL (Fritz & Kjemtrup, 2003, Hovius, 2005).

Cães sintomáticos apresentam títulos de anticorpos mais elevados no soro, podem progredir para a recuperação clínica, seguindo-se uma fase de convalescença caracterizada por um equilíbrio entre as espiroquetas e o sistema imunitário do hospedeiro. Quando esse equilíbrio é perturbado, os níveis de espiroquetas aumentam, provocando a recorrência dos sintomas (Hovius, 2005).

### 1.1.2.3. Diagnóstico

O diagnóstico da BL deve basear-se em vários aspectos, nomeadamente, história de exposição a carrças do género *Ixodes* numa zona endémica, presença de sintomas ou sinais clínicos compatíveis com a doença de Lyme, dados laboratoriais que evidenciem infecção, exclusão de outras doenças e possível resposta ao tratamento antibiótico (Hovius, 2005).

Numa primeira aproximação ao diagnóstico, o mais importante é estabelecer a probabilidade de ocorrência de BL, uma vez que os canídeos infectados carecem de sinais patognomónicos da doença, ao contrário dos humanos que exibem um eritema *migrans* característico (Fritz & Kjemtrup, 2003). Por outro lado, os resultados laboratoriais por si só não são suficientes para fazer o diagnóstico, mas devem ser interpretados de acordo com a probabilidade de existência de BL no animal.

Actualmente, estão disponíveis diversas técnicas laboratoriais que permitem a detecção directa de *B. burgdorferi*, como é o caso da cultura em meios adequados e da aplicação de métodos moleculares, como o PCR. Enquanto outras técnicas permitem a detecção indirecta da doença, o caso dos métodos sorológicos, como são exemplo os testes de detecção de anticorpos.

A cultura de *B. burgdorferi* s.l. em meio líquido de Barbour-Stoenner-Kelly II (BSK II) ou noutras modificações do meio de Kelly original oferece, sem dúvida, a melhor confirmação de uma infecção activa, sendo muito usada por investigadores em todo o mundo (Quinn, Markey, Carter, Donnelly & Leonard, 2002, Aguero-Rosenfeld, 2005). Estes meios de cultura proporcionam um eficiente crescimento das espiroquetas, ainda que estas provenham de amostras com baixo grau de inóculo, o que acontece frequentemente. No entanto, o tempo de geração de *B. burgdorferi* s.l. (7 a 20h) é bastante longo e fastidioso, pelo que as culturas têm de ser incubadas em condições microaerofílicas entre 30°C a 34°C, até cerca de doze semanas (Aguero-Rosenfeld, 2005, Parola, Paddock & Raoult, 2005). A obtenção de resultados após um período de tempo tão prolongado é a grande desvantagem da cultura, o que justifica o facto de ser mais usada em trabalhos de investigação do que no diagnóstico rápido que um clínico exigiria. A observação do crescimento das espiroquetas é efectuada por microscopia de fundo negro ou de fluorescência, após coloração com o corante laranja de acridina ou com anticorpos específicos marcados por fluorescência. Ainda assim, recomenda-se a demonstração de reacção específica das espiroquetas com anticorpos monoclonais ou, em alternativa, a aplicação de métodos de PCR para detectar sequências de ADN específicas. A cultura de *B. burgdorferi* s.l. também pode ser realizada em meios sólidos com agarose, o que possibilita a sua incubação não só em condições microaerofílicas, mas também em condições de anaerobiose. Uma vantagem deste meio consiste na identificação de colónias individuais para posterior selecção de estirpes clonais particulares de *B. burgdorferi* s.l. (Aguero-Rosenfeld, 2005). Diversas amostras de tecidos e fluidos corporais de pacientes com BL constituem material para a recolha das espiroquetas. Contudo, os resultados obtidos em humanos são pobres, e apenas as biópsias de pele de pessoas com eritema *migrans* (EM) ou com acrodermatite crónica atrófica (ACA), ou plasma de doentes com EM parecem ter melhores resultados. Culturas de líquido sinovial, líquido cefalorraquidiano (LCR) e tecidos também podem ser positivos para *B. burgdorferi* s.l., mas em casos raros (Parola et al., 2005). Existe alguma controvérsia entre investigadores acerca da sensibilidade da cultura de *B. burgdorferi* s.l., sendo que uns estudos apontam para uma maior sensibilidade da cultura em relação às técnicas de PCR aplicadas em amostras de pele de humanos, enquanto outros estudos indicam o contrário (Aguero-Rosenfeld, 2005). Esta disparidade pode ser atribuída aos diferentes protocolos laboratoriais usados, tipo de PCR e/ou *primers* e/ou sequência seleccionada, bem como o tamanho do tecido de biópsia e o seu modo de conservação, ou até a técnica de cultura usada. Por outro lado, embora já seja possível cultivar todas as espécies de *B. burgdorferi* s.l., não se sabe se a sensibilidade é igual para todas.

Técnicas moleculares de PCR são amplamente usadas para detectar ADN de *B. burgdorferi* s.l. em biópsias de pele, LCR e líquido sinovial, sangue e tecidos. A eficiência deste tipo de técnicas varia em função do tamanho e volume da amostra, da colheita adequada da

amostra, da preparação do ADN e da selecção de genes e *primers*, considerando a heterogeneidade de *B. burgdorferi* s.l. (Parola et al., 2005). A sensibilidade do PCR fica reduzida pela degradação do ADN da espiroqueta durante o transporte, armazenamento e processamento da amostra recolhida. Por esta razão, as amostras devem ser analisadas o mais cedo possível após a sua colheita, ou congeladas se tal não for viável. Outros factores podem comprometer a eficácia do PCR, como a detecção de ADN do hospedeiro e a presença de inibidores de PCR em amostras de sangue, urina, líquido sinovial e LCR (Aguero-Rosenfeld, 2005). A técnica quantitativa de PCR em tempo real, é utilizada para contabilizar o número de espiroquetas presentes em amostras de ratinhos de campo, cães, carraças e pacientes com BL. Outras aplicações deste método incluem a genotipagem de espécies de *B. burgdorferi* s.l. em carraças e humanos com EM na Europa, bem como a detecção simultânea de *B. burgdorferi* s.s. e *A. phagocytophilum* em carraças infectadas (Aguero-Rosenfeld, 2005). As técnicas moleculares de PCR variam na sua sensibilidade, apresentando valores de sensibilidade elevada para amostras de biópsias de pele e de líquido sinovial de pacientes com BL, que contrastam com sensibilidades baixas para amostras de sangue (plasma ou soro) e de LCR (Aguero-Rosenfeld, 2005, Hovius, 2005). Todavia, a especificidade é bastante alta, independentemente da amostra, atingindo os 100% na maioria dos casos (Aguero-Rosenfeld, 2005).

As limitações inerentes aos métodos de diagnóstico directo justificam, em certa medida, o facto das técnicas de detecção de anticorpos específicos serem mais usadas na rotina laboratorial. A sensibilidade destes ensaios sorológicos depende directamente da cinética da resposta imunitária após a infecção. Na maioria dos cães, a seroconversão de IgG ocorre antes do aparecimento de sintomas clínicos de BL, geralmente entre 4 a 6 semanas após a infecção (Fritz & Kjemtrup, 2003).

A IFI usa organismos cultivados e fixados em lâminas e exige a leitura num microscópio de fluorescência. Uma desvantagem da IFI consiste na subjectividade da leitura e interpretação do grau de fluorescência observada, pelo que se torna necessário ter pessoal bem treinado. Algumas modificações desta técnica, designadamente a aplicação de antígenos em membranas em vez de lâminas, permitem efectuar uma leitura automatizada dos graus de fluorescência, evitando erros de interpretação de resultados (Aguero-Rosenfeld, 2005).

Ainda assim, a IFI é ultrapassada por outros métodos sorológicos mais práticos e automatizados, nomeadamente ELISA e *enzyme-linked fluorescent assay* (ELFA). O teste de ELISA é a modalidade mais frequentemente usada para detectar anticorpos IgG, IgM e IgA individualmente ou em combinação (IgG e IgM). Os *kits* actualmente disponíveis podem conter antígenos purificados (componentes flagelares), antígenos recombinantes (P39 ou VlsE), ou péptidos sintéticos (IR6 ou C6). A sensibilidade do teste varia bastante, observando-se valores inferiores a 50% em soros de pacientes com EM numa fase aguda, em menos de uma semana. No entanto, a sensibilidade pode aumentar rapidamente após a



primeira semana. Valores mais elevados ocorrem em doentes sintomáticos com múltiplos EM ou com envolvimento extracutâneo (por exemplo, cardite ou neuroborreliose), assim como em fases avançadas da doença, em que há artrites (Aguero-Rosenfeld, 2005). As principais desvantagens do ELISA incluem a falta de standardização, quer em termos de variação na composição antigénica, quer na detecção de classes específicas de imunoglobulinas, particularmente na identificação de IgM. Por outro lado, a ocorrência de reacções cruzadas e a escolha do material absorvente usado para diluir os soros podem prejudicar a especificidade do teste. Por este motivo, amostras de soro positivas ou duvidosas em testes de IFI, ELISA ou ELFA devem ser analisadas novamente com outro teste imunológico, o *Western blot* (WB). Esta sequência de testes é designada *two-tier testing* e consiste num protocolo melhorado, atribuindo maior precisão e especificidade aos ensaios, ainda que a sensibilidade seja ligeiramente reduzida (Fritz & Kjemtrup, 2003, Aguero-Rosenfeld, 2005, Parola et al., 2005). Segundo alguns estudos realizados para comprovar a eficácia deste método, a sensibilidade dos testes pode apresentar valores de cerca de 40% numa fase inicial da doença, mas aumenta significativamente numa fase de reconvalescença, enquanto a especificidade mantém-se nos 99% (Aguero-Rosenfeld, 2005). O WB utiliza antígenos separados de acordo com o seu peso molecular, permitindo assim identificar os antígenos de *B. burgdorferi* s.l. que são imunodominantes em diferentes etapas da BL. Na Europa, já foram isoladas diversas espécies e estirpes de *B. burgdorferi* s.l. com origem em localizações geográficas distintas (Aguero-Rosenfeld, 2005). As diferenças inter- e intra-específicas entre os antígenos imunodominantes e a selecção destes para o WB afectam a detecção de anticorpos nas amostras. Assim como a duração da infecção, que condiciona a presença de IgM ou IgG, e a qualidade dos antígenos usados podem influir na detecção de reactividade no WB. Numa tentativa de standardizar o diagnóstico sorológico da BL, foram criadas linhas directrizes para a interpretação do WB. Mas a falta de consenso quanto aos critérios a usar, levou à consideração de que possivelmente serão necessários diferentes critérios para cada espécie de *B. burgdorferi* s.l., na Europa. Neste continente, os níveis de reactividade imunológica são função da manifestação específica da BL. Veja-se, por exemplo, o caso do antígeno OspC da estirpe *B. garinii*, que possui maior reactividade na detecção de IgM em pacientes com neuroborreliose, do que o OspC de outras estirpes de *B. burgdorferi* s.l.. Isto deve-se provavelmente ao facto de *B. garinii* representar a estirpe que provoca casos de neuroborreliose com maior frequência, na Europa (Aguero-Rosenfeld, 2005). A sensibilidade do WB é muito semelhante à do teste de ELISA para soros de pacientes com sinais extracutâneos ou em fases tardias da doença. Quanto à especificidade do WB, é superior à do ELISA, uma vez que a interpretação dos resultados do WB depende da presença de bandas de reactividade imunológica específica, ainda assim, não atinge os 100%. De facto, o padrão das bandas do WB não só realçam a fiabilidade do teste, mas fornecem

informação fundamental para diferenciar respostas imunitárias induzidas por infecção natural com *B. burgdorferi* s.l. ou produzidas pela vacinação, em cães. Cães e humanos infectados naturalmente apresentam respostas imunológicas para numerosas proteínas entre os 15 e os 100 kD, e o número de bandas visíveis tende a aumentar com a progressão da doença (Fritz & Kjemtrup, 2003). As principais limitações do WB incluem a subjectividade na leitura e interpretação da intensidade das bandas, que pode estar na origem de falsos positivos, o custo do ensaio, a variabilidade nas respostas de anticorpos em pacientes com sintomas idênticos de BL e ainda a falta de standardização da fonte de antígenos usados e da sua preparação para o WB (Aguero-Rosenfeld, 2005).

#### 1.1.2.4. Tratamento

Na ausência de sintomas clínicos de BL, o tratamento é raramente indicado para cães com evidência sorológica de exposição a *B. burgdorferi*. Ainda que o número de cães seropositivos numa região endémica seja elevado, a proporção desses cães que irá desenvolver sinais clínicos é bastante baixa, pelo que a terapêutica nem sempre é necessária. O tratamento antibiótico nos cães, assim como em humanos com BL, pode acelerar a resolução clínica da doença e reduzir a probabilidade de recidivas. Um estudo revelou que a inoculação experimental de cães com *B. burgdorferi* produziu culturas positivas de amostras de pele antes do tratamento, e que após 30 dias de tratamento com azitromicina (25 mg/kg, PO, SID), ceftriaxona (25 mg/kg, IV, SID) ou doxiciclina (10 mg/kg, PO, BID), as biópsias de amostras de múltiplos tecidos testaram negativamente na cultura das espiroquetas. Outra investigação similar, em cães inoculados experimentalmente, demonstrou que a administração de corticosteróides, em doses imunossupressoras, resultou em recorrência de claudicação severa em 2 de 2 cães que não tinham recebido tratamento antibiótico, mas não foram observadas recidivas nos 12 cães tratados com fármacos antibióticos. A doxiciclina (10 mg/kg BID, PO, durante 28 dias) é o antibiótico de eleição, mas a amoxicilina (20 mg/kg TID, PO, durante 28 dias) pode ser uma escolha melhor para animais jovens (Hovius, 2005). É de notar, no entanto, que a prescrição de medicamentos antibióticos, baseada somente em resultados sorológicos arbitrariamente realizados, muito provavelmente não diminuirá a morbilidade, nem será eficaz na prevenção duma possível reexposição a *B. burgdorferi* em zonas endémicas (Fritz & Kjemtrup, 2003). Aliás, os anticorpos IgM e IgG podem permanecer durante 10 a 20 anos, mesmo na ausência de infecção activa (Ferreira, 2008).

#### 1.1.2.5. Prevenção

A imunização através da vacinação pode providenciar uma protecção acrescida em zonas endémicas. Existem duas vacinas desenvolvidas a partir de bacterinas de *B. burgdorferi* para canídeos, que conferem uma protecção eficaz e segura contra o desenvolvimento da

BL em várias raças de cães (Fritz & Kjemtrup, 2003, Hovius, 2005). No entanto, estas vacinas apenas protegem contra infecções específicas de *B. burgdorferi* s.s. e têm uma duração curta (inferior a 1 ano). Outra vacina recombinante, que contém o gene OspA, provou ser eficaz na protecção de cães contra a infecção por *I. scapularis* infectados naturalmente. Para ambos os tipos de vacinas, recomenda-se a administração de uma dose inicial, seguida de um reforço 2 a 4 semanas depois, associada à revacinação anual (Fritz & Kjemtrup, 2003, Hovius, 2005). A vacinação deve preconizar-se em animais com elevado risco de contraírem a doença e que não tenham tido contacto prévio com o agente patogénico (Fritz & Kjemtrup, 2003).

### **1.1.3. Erliquiose monocítica canina**

#### **1.1.3.1. Etiologia e Epidemiologia**

A erliquiose monocítica canina (EMC) é causada por *Ehrlichia canis*, uma bactéria (0,5-1,5 µm) intracelular obrigatória, pleomórfica e Gram-negativa, da família Anaplasmataceae, afectando particularmente os monócitos e macrófagos do hospedeiro (McQuiston et al., 2003, Harrus et al., 2005). A doença é mantida em hospedeiros silvestres e transmitida entre animais pela picada de ixodídeos. Os animais domésticos (cão, gato, equinos e ruminantes) (McQuiston et al., 2003) e os humanos são hospedeiros acidentais, apesar da doença ser potencialmente fatal para os canídeos domésticos e silvestres, sendo transmitida pelo vector *Rhipicephalus sanguineus* (Harrus et al., 2005).

Nos vectores, a transmissão é transtadial, as larvas e ninfas infectam-se aquando da refeição num vertebrado infectado e passam o agente patogénico ao hospedeiro depois de se transformarem em ninfas e adultos, respectivamente (McQuiston et al., 2003, Harrus et al., 2005). Mas a doença também pode ser transmitida através de transfusões sanguíneas (Harrus et al., 2005).

A distribuição geográfica da EMC está relacionada com a ocorrência dos vectores, observando-se maior incidência da doença nos meses mais quentes, quando a densidade das populações de vectores é maior (McQuiston et al., 2003, Harrus et al., 2005). A propagação de *E. canis* é mundial, tendo sido identificada na Europa (Harrus et al., 2005, Solano-Gallego, Trotta, Razia, Furlanello & Caldin, 2006, Tsachev, 2006, Santos et al., 2009), África (Inokuma et al., 2006), Médio Oriente (Fishman et al., 2003), Ásia e América (Harrus et al., 2005, Yabsley et al., 2007, Carvalho, Wenceslau, Carlos & Albuquerque, 2008). Em Portugal, há registo de prevalências de cerca de 50% em cães domésticos da região de Lisboa (Duarte, 2008), e a presença de *E. canis* já foi verificada em ixodídeos da espécie *R. sanguineus* (Figueiredo, 2007).

Na Venezuela, foi detectado um caso de infecção num homem (Harrus et al., 2005,9), apesar da ehrlichiose monocítica humana ser geralmente causada por *E. chaffeensis* (McQuiston et al., 2003). No entanto, *E. canis* demonstra alguma especificidade de

hospedeiros da família Canidae, principalmente para os canídeos selvagens, como raposas (*V. vulpes* e *U. cinereoargenteus*), lobos (*C. lupus*), coiotes (*C. latrans*) e chacais (*Canis aureus* e *Canis mesomelas*) (Fishman et al., 2003, Figueiredo, 2007). Dois estudos realizados em Israel, em raposas (*V. vulpes*) e chacais (*C. aureus*), demonstraram prevalências de infecção por *E. canis* de 36% para ambas as espécies. Os autores indicam valores semelhantes nos canídeos domésticos daquela região (30%), sugerindo a existência de interacção entre as 3 espécies de hospedeiros, como a partilha do *habitat* e dos mesmos vectores (*R. sanguineus*) em estádios diferentes do seu desenvolvimento (Fishman et al., 2003).

#### 1.1.3.2. Patogenia e Sintomas

Durante a refeição, as carraças injectam as bactérias, juntamente com a saliva, nos vasos sanguíneos e linfáticos do hospedeiro. Ao longo do período de incubação (8 a 20 dias) (Harrus et al., 2005, Figueiredo, 2007), as bactérias invadem os macrófagos, principalmente do baço e fígado, onde se replicam por divisão binária. Os macrófagos infectados disseminam então a infecção para outros órgãos (Harrus et al., 2005).

Após o período de incubação, pode desenvolver-se doença aguda, subclínica ou crónica, consoante a patogenicidade da estirpe de *E. canis*, a raça, a presença de doenças concomitantes e o estado imunitário do hospedeiro (McQuiston et al., 2003, Harrus et al., 2005, Figueiredo, 2007). A fase aguda da EMC pode durar uma a 4 semanas e a maior parte dos cães recupera bem, com tratamento apropriado. Os sinais clínicos nesta fase podem ser inespecíficos, incluindo depressão, letargia, anorexia, pirexia, taquipneia e perda de peso, ou mais característicos, como a linfadenomegália, esplenomegália, hepatomegália (Figueiredo, 2007), aparecimento de petéquias e equimoses na pele e mucosas (Harrus et al., 2005, Figueiredo, 2007) e, ocasionalmente, epistaxis, vômito, corrimento seroso ou purulento óculo-nasal e dispneia (Harrus et al., 2005). Cães que não recebem tratamento podem iniciar uma fase subclínica da doença, permanecendo portadores persistentes de *E. canis* durante meses a anos. Alguns animais recuperam espontaneamente, enquanto outros evoluem para uma fase crónica grave da EMC. Nesta etapa, a sintomatologia é semelhante à observada na fase aguda, mas com maior gravidade, podendo mesmo ser fatal em cães imunodeprimidos ou de determinadas raças (Pastor Alemão) (McQuiston et al., 2003). Assim, podem aparecer sinais como palidez das membranas mucosas, emaciação e edemas periféricos, sinais de patologia ocular (conjuntivite, edema, panuveíte, hifema e descolamento da retina) e neurológica (ataxia, convulsões, parésia, hiperestesia, défice dos nervos craniais e sinais vestibulares). Tanto os sintomas oculares como os neurológicos podem surgir também na fase aguda (Harrus et al., 2005).

Alguns mecanismos imunológicos parecem estar envolvidos na patogenia da infecção, uma vez que resultados positivos nos testes de Coombs e de autoaglutinação sugerem que a

infecção possa induzir a produção de anticorpos que se ligam às membranas dos eritrócitos, embora este mecanismo não esteja ainda totalmente esclarecido. Adicionalmente, a trombocitopenia observada na EMC parece resultar da acção conjunta de vários factores, nomeadamente o consumo elevado de plaquetas, sequestro no baço e encurtamento do tempo de vida médio das plaquetas, numa fase aguda, bem como a redução da produção de plaquetas numa fase crónica (Harrus et al., 2005, Figueiredo, 2007).

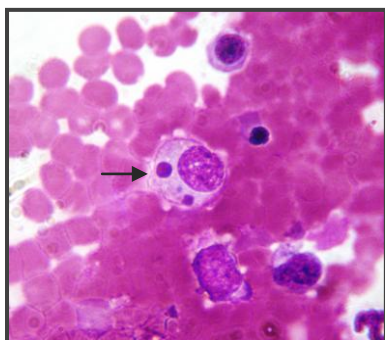
A trombocitopenia é a alteração hematológica mais frequente e consistente na EMC, associada geralmente a leucopenia e anemia moderadas, monocitose e presença de linfócitos granulados, na fase aguda (Harrus et al., 2005). Animais subclínicos podem apresentar trombocitopenia ligeira, mas o mesmo não acontece na fase crónica da doença, em que surge tipicamente pancitopenia, por supressão da medula óssea, e anemia não regenerativa (Harrus et al., 2005, Figueiredo, 2007). A hipoalbuminemia e a hiperglobulinemia (por hipergamaglobulinemia) são achados comuns. Como foi referido, cães infectados com *E. canis* podem revelar testes de anticorpos anti-plaquetas e de Coombs positivos, para além de poderem demonstrar complexos imunes em circulação (Harrus et al., 2005).

*R. sanguineus* é vector de outros agentes patogénicos, pelo que animais com EMC podem estar co-infectados com *Babesia canis*, *Hepatozoon canis*, *Anaplasma phagocytophilum* e *A. platys*, que podem influenciar a evolução da doença, complicando a condição clínica do animal. Nos canídeos silvestres, a infecção por *E. canis* geralmente apresenta um quadro clínico mais benigno do que nos cães domésticos (Figueiredo, 2007).

### 1.1.3.3. Diagnóstico

O diagnóstico de EMC deve basear-se numa história de exposição ao vector, nos sintomas clínicos e na analítica laboratorial concordantes, associados aos resultados de testes sorológicos, moleculares ou de cultura da bactéria. Contudo, a importância de estabelecer um diagnóstico correcto e rápido consiste principalmente na boa capacidade de resposta ao

**Figura 3** – Mórula (seta) de *E. canis* num esfregaço de medula óssea de um cão infectado naturalmente. (Dantas-Torres, 2008)



tratamento na fase aguda da doença (Harrus et al., 2005).

A observação de esfregaços de sangue corados pelo método de Giemsa, nessa fase da doença, permite visualizar mórulas de *E. canis* no citoplasma dos monócitos (Figura 3), em cerca de 4% dos casos, diagnosticando a EMC (Harrus et al., 2005). No entanto, esta técnica é pouco sensível, e a não observação do parasita não exclui a possibilidade de existir infecção por *E. canis* (McQuiston et al., 2003).

Os testes sorológicos disponíveis, como a IFI, ELISA ou IB, são amplamente usados no diagnóstico de EMC, como complemento ao diagnóstico clínico (McQuiston et al., 2003).

A IFI é o método de escolha para a detecção e titulação de anticorpos para *E. canis*, pelas boas sensibilidade e especificidade que apresenta. A verificação de um aumento em 4 vezes dos títulos de anticorpos é indicativa de infecção activa, por essa razão, devem ser realizados dois testes consecutivos, com uma a 2 semanas de intervalo. A principal desvantagem da IFI consiste na reactividade cruzada observada, por vezes, nas regiões endémicas, onde outras espécies de *Ehrlichia* spp. são prevalentes (McQuiston et al., 2003). Já foram registadas reacções cruzadas com *E. ewingii*, *E. chaffeensis*, *A. phagocytophilum*, *Neorickettsia risticii* e *N. helminthoeca*, mas até ao momento, não se verificou reacção cruzada entre *E. canis* e *A. platys* (Harrus et al., 2005).

O teste convencional de ELISA (IgG) é bastante útil, aliás, recentemente foi utilizado com sucesso usando uma proteína recombinante, a Map2. Outros testes de dot-ELISA, de aplicação rápida, mostraram ser sensíveis e específicos na detecção de anticorpos para *E. canis*. Estes testes podem usar bactérias cultivadas ou proteínas específicas de *E. canis* (p30 ou p30/31) como antígenos. Também o IB revelou eficácia na detecção de reacção de soros infectados com proteínas de *E. canis* com peso molecular de 28 a 30 kDa (Harrus et al., 2005). Um estudo comparativo revelou uma boa correlação entre os testes de IFI, ELISA e WB, mas a IFI detectou mais casos positivos de baixos títulos de anticorpos, sugerindo uma maior sensibilidade nesta técnica ou, mais provavelmente, uma especificidade menor associada à reactividade cruzada entre *Ehrlichia* spp. (O'Connor, Hanscom, Hegarty, Groat & Breitschwerdt, 2006). Alternativamente às técnicas sorológicas, os métodos moleculares de PCR e a cultura de bactérias em linhas celulares de macrófagos (DH82 e J774.A1) permitem diagnosticar a doença pela observação directa de *E. canis* ou do seu ADN, respectivamente, mas necessitam de equipamento especial (Harrus et al., 2005).

A ocorrência de infecções concomitantes pode dificultar o diagnóstico de EMC, pelo que a combinação de várias técnicas é aconselhada (Harrus et al., 2005).

#### 1.1.3.4. Tratamento

As tetraciclinas têm mostrado bons resultados no tratamento da EMC aguda, particularmente a doxíciclina (10 mg/kg SID, PO ou 5 mg/kg BID, PO, durante 2 a 3 semanas) (McQuiston et al., 2003, Harrus et al., 2005). Grande parte dos casos agudos respondem à terapêutica em apenas 24 a 72 horas, com melhoria dos sintomas clínicos. Cães que sofrem de EMC crónica grave geralmente não melhoram com o tratamento.

Outro fármaco tem sido associado à doxíciclina, o dipropionato de imidocarb, apesar de não ser muito eficaz no tratamento da EMC. Normalmente, sua utilização é indicada nos casos de infecções concomitantes com *Babesia* spp. ou *H. canis*. Adicionalmente, o hidroclorato de tetraciclina (22 mg/kg TID), a oxitetraciclina (25 mg/kg TID), a minociclina (20 mg/kg BID) e o cloranfenicol (50 mg/kg TID) são também eficazes na terapêutica da doença.

Após o tratamento, os níveis de anticorpos para *E. canis* podem persistir durante meses ou anos, sugerindo uma resposta imunitária aberrante por parte do hospedeiro ou insucesso da terapêutica aplicada, ainda assim, a diminuição progressiva das concentrações de gamaglobulinas estão associadas à eliminação do parasita. É de notar que a presença de anticorpos para *E. canis* não protege contra uma nova infecção, por isso, cães seropositivos permanecem susceptíveis à infecção, mesmo depois duma terapêutica bem sucedida (Harrus et al., 2005).

#### **1.1.3.5. Prevenção**

Actualmente, não existe nenhuma vacina eficaz na prevenção da EMC (McQuiston et al., 2003, Harrus et al., 2005). O controlo dos vectores, com acaricidas, constitui a medida preventiva mais eficiente, apesar de nem sempre ser praticável. Recentemente, foi preconizado o tratamento profilático de cães do exército Francês no Senegal, Costa do Marfim e Djibouti, com oxitetraciclina (250 mg/cão SID, PO). Estimou-se uma taxa de insucesso do tratamento de 0,9%, contudo, esta medida deve ser reservada a casos em que todos os outros métodos preventivos tenham falhado, de modo a evitar resistências a antibióticos (Harrus et al., 2005).

#### **1.1.4. Febre botonosa canina**

##### **1.1.4.1. Etiologia e Epidemiologia**

A febre botonosa canina (FBC), ou febre escaro-nodular, é causada por bactérias do complexo *Rickettsia conorii* (Rovero, Brouqui & Raoult 2008), da família Rickettsiaceae (Figueiredo, 2007). São bactérias (0,8-2x0,3-0,5 µm) intracelulares obrigatórias, Gram-negativas, que coram pelos métodos de Giemsa e Gimenez (Parola, Paddock & Raoult, 2005, Duarte, 2008, Rovero et al, 2008) e parasitam preferencialmente as células endoteliais (Sousa, Nóbrega, Bacellar & Torgal, 2003) de vertebrados domésticos e silvestres, incluindo o Homem. A doença distribui-se por vários países do sul e centro da Europa, África e Índia, sendo transmitida predominantemente pela carraça *R. sanguineus* (Sousa et al., 2003, Brouqui, Parola, Fournier & Raoult, 2007, Rovero et al, 2008), embora haja relatos de infecção noutras espécies de ixodídeos (*Rhipicephalus* spp., *Hyalomma* spp. e *Haemaphysalis* spp.) (Rovero et al, 2008).

O complexo *R. conorii* inclui diferentes subespécies, nomeadamente, *R. conorii conorii*, encontrada na bacia do Mediterrâneo (Parola et al., 2005, Rovero et al, 2008), Croácia, Eslovénia, Quênia, Somália, África do Sul e região do mar Negro (Turquia, Bulgária, Ucrânia e Roménia), *R. conorii israelensis*, isolada em Portugal, Sicília e Israel (Blanco & Oteo, 2006, Brouqui et al., 2007, Rovero et al, 2008), *R. conorii caspia*, identificada na região de Astrakhan e no Kosovo e *R. conorii indica*, encontrada na Índia e no Paquistão. Todas elas pertencem ao grupo das febres exantemáticas (*spotted fever group/SFG*), apresentando

estirpes distintas que causam doenças com diferentes sintomatologias, em áreas geográficas diversas. A subespécie *R. conorii conorii* é responsável pela febre botonosa, também designada *Mediterranean spotted fever* (MSF) (Rovero et al, 2008).

A incidência da doença tem variado ao longo do tempo, observando-se a sua reemergência em vários países, como Itália, Espanha e sul de França, e também em Portugal (Parola et al., 2005, Rovero et al, 2008), onde o número de hospitalizações humanas aumentou de menos de 200 para mais de 400 casos por ano (Sousa et al., 2003). Na Europa, apenas Portugal e Itália têm programas de vigilância da febre botonosa (Rovero et al, 2008), em que a doença é de declaração obrigatória (Sousa et al., 2003, Direcção dos Serviços de Epidemiologia e Estatísticas da Saúde, 2008), o que sugere que nos restantes países a doença pode estar relativamente subdiagnosticada. A distribuição da febre botonosa correlaciona-se com a ocorrência dos vectores (Brouqui et al., 2007, Rovero et al, 2008), pelo que o aumento das populações de ixodídeos e o maior contacto dos animais e pessoas com o habitat das carraças pode justificar a variação na incidência da doença (Parola et al., 2005, Rovero et al, 2008). Adicionalmente, factores climáticos, como o aumento da temperatura, menor precipitação e ausência de geadas podem condicionar a ocorrência da doença. A maior mobilidade das pessoas e animais fez com que surgissem casos esporádicos em países não endémicos (Rovero et al, 2008).

Em Portugal, existem duas estirpes de *R. conorii* que provocam febre botonosa, a estirpe *R. conorii* Malish (ou 7#), isolada a partir de amostras de humanos e do vector *R. sanguineus*, e a estirpe *Israeli tick typhus*, isolada apenas em amostras de humanos (Parola et al., 2005, Rovero et al, 2008). Mas outras espécies têm sido identificadas no nosso país, incluindo *R. massiliae* (Parola et al., 2005, Brouqui et al., 2007), *R. aeschlimannii* (Parola et al., 2005, Blanco & Oteo, 2006), *R. slovacica* (Sousa et al., 2003, Galvão et al., 2005, Parola et al., 2005), *R. helvetica* (Sousa et al., 2003, Galvão et al., 2005, Parola et al., 2005) e *R. sibirica* (Sousa, Barata, Vitorino, Santos-Silva, Carrapato, Torgal, Walker & Bacellar, 2006), entre outras.

O agente etiológico é transmitido pela picada duma carraça infectada, aquando da refeição no hospedeiro, e são necessárias entre 6 a 20 horas de parasitação para que a transmissão seja efectiva (Sousa et al., 2003). No vector, a transmissão é transtadial e transovárica (Brouqui et al., 2007, Rovero et al, 2008), ainda que a última não esteja comprovada em *R. sanguineus* (Figueiredo, 2007). Curiosamente, *R. sanguineus* está distribuído mundialmente, enquanto *R. conorii conorii* é encontrada apenas em certas regiões do globo, sendo os canídeos, os principais hospedeiros destes ixodídeos, também distribuídos mundialmente. Por esta razão, e pelo facto de apenas uma pequena proporção de *R. sanguineus* estar, de facto, infectada (menos de 15%), suspeita-se que este ixodídeo possa não ser o verdadeiro reservatório da doença. Actualmente, não se conhece o reservatório para *R. conorii conorii*, mas sabe-se que os cães domésticos são potenciais hospedeiros transportadores das



riquetsias para os seus donos. Aliás, em certas zonas do sul da Europa, foi estabelecida uma relação entre a percentagem de canídeos com anticorpos para *R. conorii conorii* e a prevalência de febre botonosa em humanos. Contudo, os cães apresentam bacteriemia transitória e doença febril, pelo que não parecem ser reservatórios eficientes dos agentes patogénicos (Rovero et al, 2008). Por outro lado, alguns estudos sobre a doença mostraram que os coelhos podem ter bacteriemia sem apresentar doença grave, o que sugere que estes animais podem constituir bons reservatórios para as riquetsias. Adicionalmente, outro estudo revelou que os coelhos bravos (*Oryctolagus cuniculus*) podiam ter um papel importante na transmissão das bactérias, uma vez que foi observada uma queda significativa da taxa de casos de febre botonosa na região mediterrânica de França, durante um surto de mixomatose que dizimou quase todos os coelhos bravos daquela zona. Mais tarde, a febre botonosa reapareceu com o ressurgimento da população de coelhos bravos. Outra investigação paralela permitiu verificar uma percentagem de 76,5% de coelhos bravos e 25% de lebres com anticorpos para *R. conorii conorii* em Salamanca (Espanha) (Rovero et al, 2008). Pequenos roedores e ouriços terrestres são também potenciais reservatórios, pois foi comprovada a presença de anticorpos para a riquetsia nestes animais (Duarte, 2008, Rovero et al, 2008), assim como espécies cinegéticas, incluindo o javali (*Sus scrofa*) (Galvão et al., 2005), o veado (*Cervus elaphus*) e o gamo (*Dama dama*) (Duarte, 2008). Apesar de não estarem directamente envolvidas na transmissão das bactérias, estas espécies silvestres têm uma função importante na manutenção e dispersão dos vectores infectados, podendo estabelecer uma ligação com o ciclo doméstico (entre o cão e o Homem) (Duarte, 2008). Nas espécies domésticas, os cães, gatos, ovinos, caprinos e bovinos (Galvão et al., 2005, Duarte, 2008) já demonstraram estar infectados por *R. conorii* (Duarte, 2008).

Em Portugal, a prevalência de *R. conorii* em canídeos já foi comprovada em diversos estudos que apresentaram valores desde 38,5% (Alexandre, 2006), 85,6% (Bacellar, Dawson, Silveira & Filipe, 1995) a 88,5% (Ferreira, 2008). No entanto, o potencial patogénico de *R. conorii* em canídeos ainda não está bem definido (Duarte, 2008). A doença humana é endémica em Portugal, sendo a única riquetsiose conhecida com impacto em Saúde Pública, com cerca de 1000 novos casos declarados anualmente (Figueiredo, 2007), apesar de se estimar que existam cerca de 7 vezes mais casos que os notificados anualmente (Sousa et al., 2003). O distrito de Bragança é o que apresenta maior incidência (60,5/10<sup>5</sup> habitantes), seguido dos distritos de Beja, Coimbra e Castelo Branco (Sousa et al., 2003). No distrito de Bragança, a transmissão da doença está associada a *Dermacentor reticulatus*, *D. marginatus* e *R. sanguineus*, enquanto que no distrito de Setúbal, a bactéria foi identificada na hemolinfa de *Rhipicephalus pusillus*, *R. bursa*, *R. annulatus*, *Ixodes ricinus*, *Hyalomma marginatum* e *H. lusitanicum*. Na região do Algarve, 22,2% dos ixodídeos *R. sanguineus* colhidos tinham agentes do género *Rickettsia* (Figueiredo, 2007).

#### 1.1.4.2. Patogenia e Sintomas

Uma vez inoculadas no organismo do hospedeiro vertebrado, as riquetsias entram na circulação sanguínea e infectam as células endoteliais, provocando vasculite generalizada com necrose endotelial e disseminação das bactérias (que se multiplicam por divisão binária) a outras células do hospedeiro (Greene, 2005, Figueiredo, 2007). As lesões vasculares originam a activação dos mecanismos de coagulação. O consumo de plaquetas e a sua destruição podem ser causados por processos de coagulação e imunomediados, respectivamente. Nos casos graves ou prolongados da doença, sem tratamento, alguns órgãos (pele, cérebro, coração e rins) podem desenvolver múltiplos focos de necrose. Ainda assim, a insuficiência multi-sistémica ocorre com menos frequência nos cães do que nas pessoas. Adicionalmente, as lesões vasculares permitem a extravasão de fluídos intravasculares para o espaço extracelular, originando a formação de edemas e a acumulação de fluídos nos tecidos, agravando assim o estado clínico dos animais (Greene, 2005). Em termos de sintomatologia, o aparecimento brusco de febre alta (Greene, 2005, Solano-Gallego et al., 2006, Harrus et al., 2007) é um dos sinais mais consistentemente observados, podendo desenvolver-se alguns dias após a exposição ao vector. Está associada a letargia, lentidão mental e inaptidão. Os animais apresentam movimentos rígidos, com artralgia e mialgia, mostrando dificuldade em levantar-se e relutância a andar. Pode também surgir linfadenomegália regional, hiperemia das membranas mucosas e edema subcutâneo, ou mesmo necrose a nível da derme nos casos mais graves. Outras complicações podem surgir, como sinais de patologia ocular (hifema) e neurológica (hiperestesia, convulsões, alterações vestibulares), nos animais diagnosticados ou tratados tardiamente (Greene, 2005). Na Sicília, cães expostos a ixodídeos apresentaram anorexia, letargia, vômitos e claudicação intermitentes, assim como trombocitopenia, anemia e hipoalbuminemia (Solano-Gallego et al., 2006).

A recuperação é rápida e eficiente nos cães que recebem tratamento atempadamente, mas pode ser prolongada nos casos que já desenvolveram lesões em diferentes órgãos ou sinais neurológicos (Greene, 2005). No entanto, infecções concomitantes com *B. burgdorferi* e *A. phagocytophilum* podem agravar o quadro clínico e dificultar o diagnóstico da doença (Solano-Gallego et al., 2006).

#### 1.1.4.3. Diagnóstico

O diagnóstico da FBC deve basear-se no quadro clínico e na história de exposição ao vector, bem como nos resultados de testes de diagnóstico directos ou indirectos.

O diagnóstico directo pode ser realizado pelo isolamento das riquetsias em culturas de células, por visualização em biópsias de pele, através de métodos histoquímicos, ou ainda pela aplicação de técnicas moleculares (Parola et al., 2005).

A cultura continua a ser o meio de diagnóstico mais definitivo, apesar de requerer instalações e equipamento especiais em condições de bio-segurança de nível 3, bem como técnicos especializados (Greene, 2005, Parola et al., 2005, Brouqui et al., 2007, Figueiredo, 2007). A cultura pode ser efectuada por inoculação em animais de laboratório ou ovos embrionados, ou alternativamente, em culturas de células (células Vero, L929, HEL, XTC-2 ou MRC5), utilizando para isso, amostras de sangue, biópsias de pele ou vectores (Parola et al., 2005, Brouqui et al., 2007). Outra técnica de diagnóstico de FBC consiste na coloração, pelos métodos de Giemsa e Gimenez, de lâminas com amostras obtidas a partir de necrópsias ou biópsias de pele. Esta técnica é bastante simples, mas pouco sensível, pelo que não permite distinguir diferentes espécies de *Rickettsia* spp. (Parola et al., 2005).

No que respeita os métodos moleculares, o PCR é usado com bastante sensibilidade e alguma rapidez na detecção e identificação das riquetsias em amostras de sangue, biópsias de pele (Greene, 2005, Brouqui et al., 2007) e vectores (Parola et al., 2005, Brouqui et al., 2007). Recentemente, a utilização do *nested*-PCR permitiu aumentar a sensibilidade do teste, quando aplicado em amostras de soro, linfonodos e biópsias de pele, verificando-se valores de 100% de especificidade e 68% de sensibilidade, cerca de 2,2 vezes superiores à cultura e 1,5 vezes superior ao PCR convencional. Contudo, estes testes estão sempre sujeitos a contaminação, com obtenção de resultados falso-positivos (Parola et al., 2005).

Os meios de diagnóstico indirectos consistem em testes sorológicos, sendo usados amplamente e com frequência os testes de Weil-Felix, micro-imunofluorescência (MIF), IFI, ELISA e *Immuno blot* (IB). O teste de Weil-Felix foi das primeiras técnicas a serem usadas, e ainda hoje é aplicado em alguns países para detectar anticorpos para vários antígenos *Proteus* spp. que apresentam reactividade cruzada com as riquetsias, apesar disso tem baixas sensibilidade e especificidade o que o torna um teste obsoleto (Sousa et al., 2003, Parola et al., 2005). O teste de MIF é usado em muitos laboratórios para determinar anticorpos específicos (IgM e IgG) (Parola et al., 2005, Brouqui et al., 2007). Quando os níveis de IgM não são elevados na primeira amostra, podem obter-se resultados a partir da titulação de anticorpos IgG na fase de convalescença da doença (com um intervalo de 2 a 3 semanas) (Greene, 2005). Num estudo, a MIF revelou sensibilidades entre os 46% e os 100% para a febre botonosa, consoante as amostras tinham sido colhidas nos primeiros dias de infecção ou ao fim de um mês, respectivamente (Parola et al., 2005). Actualmente, a técnica mais utilizada é a IFI (Sousa et al., 2003, Brouqui et al., 2007, Figueiredo, 2007), cujo diagnóstico implica um aumento de pelo menos 4 vezes dos títulos de anticorpos entre amostras colhidas com cerca de 2 semanas de intervalo (Brouqui et al., 2007). A prova de ELISA, tal como a IFI, permite a diferenciação de IgM e IgG (Figueiredo, 2007). O IB é considerado mais sensível do que a IFI, uma vez que consegue detectar anticorpos IgM mais cedo, mas também mais específico, apesar de ser uma técnica morosa. Aparentemente, não há diferenças evidentes entre o IB e a MIF na detecção de anticorpos

para proteínas rOmpA e rOmpB (Brouqui et al., 2007). Alternativamente à IFI, foi proposto um método à base de imunoperoxidase, que substitui a fluoresceína pela peroxidase, com possibilidade de leitura de lâminas permanentes ao microscópio óptico (Figueiredo, 2007). Uma das maiores limitações da sorologia é a reactividade cruzada que ocorre frequentemente entre géneros da mesma família (Parola et al., 2005, Alexandre, 2006) e espécies de *Rickettsia* spp., pelo que a combinação de mais do que um teste sorológico é uma medida fiável para obter um diagnóstico mais acurado (Parola et al., 2005). Por outro lado, os valores limite (*cut-off*) que estabelecem o limiar de positividade não são consensuais entre laboratórios (Figueiredo, 2007).

#### 1.1.4.4. Tratamento

A terapêutica da FBC ainda não está bem definida, pelo que se apresenta uma extrapolação do tratamento usado na febre das Montanhas Rochosas (causada por *R. rickettsii*) para a FBC, já que ambas as doenças pertencem ao grupo das febres exantemáticas e têm quadros clínicos semelhantes.

O tratamento deve ser instituído o mais precocemente possível para evitar o agravamento da sintomatologia, nomeadamente a necrose dos tecidos e a insuficiência multi-sistémica dos órgãos (Greene, 2005). Os fármacos de eleição são as tetraciclina e devem ser administrados durante uma semana. As mais usadas são a doxiciclina (5-20 mg/kg BID, PO/IV) e a tetraciclina (22-30 mg/kg TID, PO/IV) (Greene, 2005, Duarte, 2008, Ferreira, 2008). O cloranfenicol (15-30 mg/kg TID, PO/SC/IV) e as fluoroquinolonas, como a enrofloxacin (3 mg/kg BID, PO/SC) (Greene, 2005, Duarte, 2008, Ferreira, 2008), são igualmente eficazes. A azitromicina também pode ser usada, embora com menor sucesso. O tratamento precoce da FBC pode atrasar ou suprimir a subida dos títulos de anticorpos nas amostras colhidas na fase de convalescença, por isso, a sorologia deve ser aplicada antes de se iniciar a terapêutica. A resposta ao tratamento é bastante rápida (24 a 48 horas), observando-se desde logo a diminuição da temperatura corporal e a melhoria dos sintomas clínicos, ainda que possa ser necessária terapêutica de suporte. A recuperação está associada a uma protecção imunitária contra a infecção pela mesma espécie de riquétsia (Greene, 2005).

Um relato recente da infecção por *R. conorii* em cães domésticos na Sicília, refere que foi preconizado um tratamento à base de doxiciclina, com resolução dos sinais 2 dias após o início da antibioterapia e, noutro caso, foi usada ceftriaxona, com recuperação do animal 4 dias depois, o que sugere uma recuperação imunitária espontânea já que a ceftriaxona não tem eficácia antiriquétsial conhecida (Solano-Gallego et al., 2006).

#### 1.1.4.5. Prevenção

Actualmente, não há vacinas disponíveis contra a FBC, embora existam vacinas experimentais, contendo proteínas da membrana exterior, que demonstraram protecção contra infecções graves ou prolongadas (Greene, 2005).

### 1.1.5. Tularémia canina

#### 1.1.5.1. Etiologia e Epidemiologia

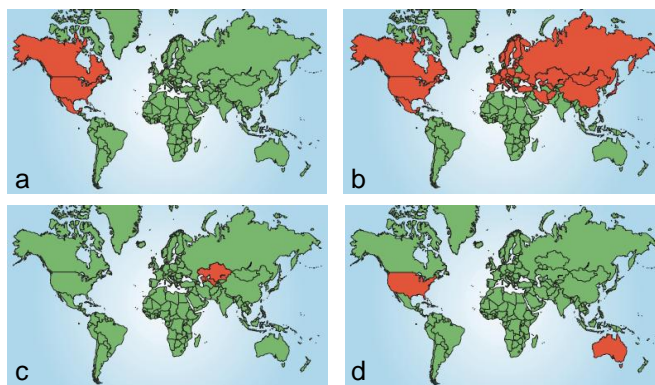
*Francisella tularensis* é o agente etiológico da tularémia, uma zoonose de cariz altamente infeccioso. Esta bactéria pertence ao género *Francisella* da família Francisellaceae, assim como a espécie *F. philomiragia*. É um pequeno cocobacilo, pleomórfico, imóvel, aeróbico, catalase-positivo e com carácter Gram-negativo. Parasita intracelular facultativo, é capaz de crescer dentro de diferentes tipos de células, nomeadamente macrófagos, monócitos, hepatócitos e células endoteliais (Figueiredo, 2007, Lopes de Carvalho, Núncio & David de Moraes, 2009). *F. tularensis* inclui 4 subespécies, segundo vários factores epidemiológicos, testes bioquímicos e de virulência: *F. tularensis tularensis* (tipo A de Jellison), *F. tularensis holarctica* (tipo B de Jellison), *F. tularensis novicida* e *F. tularensis mediasiatica*. O tipo A distingue-se do tipo B de Jellison por fermentar glicerol e constituir a forma mais virulenta para animais e humanos, existindo predominantemente na América do Norte, onde é endémica, e sendo associada a lagomorfos silvestres (Figura 4).

O tipo B de Jellison, menos virulento, é encontrado na Europa, Ásia e também na América do Norte, estando relacionado com roedores e meios aquáticos. *F. tularensis novicida* parece ser a subespécie menos virulenta para o homem, apesar de poder provocar uma síndrome semelhante à tularémia em indivíduos imunodeficientes, tendo sido isolada nos EUA, Canadá e Austrália. *F. tularensis mediasiatica* pode ser encontrada na Ásia Central e em áreas da antiga União Soviética,

aparecendo mais associada a lebres (Feldman, 2003, Splettstoesser, Tomaso, Al Dahouk, Neubauer & Schuff-Werner, 2005, Figueiredo, 2007, Lopes de Carvalho et al., 2009).

Considerada uma doença importante no século passado, a tularémia surge agora como uma zoonose emergente e re-emergente em muitos países do Hemisfério Norte. Está amplamente distribuída, afectando mais de 100 espécies de mamíferos domésticos e silvestres, incluindo humanos, mas também 25 espécies de aves e muitas outras de anfíbios

**Figura 4** – Mapa da incidência mundial das 4 subespécies de *F. tularensis* (as regiões onde a tularémia foi reportada estão indicadas a vermelho).(adaptado de Oyston et al., 2004)



**a** - *F. tularensis tularensis*; **b** - *F. tularensis holarctica*; **c** - *F. tularensis mediasiatica*; **d** - *F. tularensis novicida*

e répteis (Feldman, 2003, Figueiredo, 2007). Os artrópodes hematófagos, como carraças dos géneros *Dermacentor*, *Ixodes* e *Amblyomma*, mosquitos dos géneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles*, e tabanídeos do género *Chrysops* são potenciais vectores biológicos ou mecânicos da doença. Os roedores e os lagomorfos são indicados como os principais reservatórios de *F. tularensis*, embora haja alguma controvérsia, já que alguns autores sugerem que os artrópodes vectores também podem constituir reservatórios da bactéria, uma vez que a transmissão nos mesmos é transtadial e provavelmente transovárica (Spletstoeser et al., 2005, Lopes de Carvalho et al., 2009). Há também evidências laboratoriais de que a bactéria é capaz de crescer dentro de protozoários, como *Acanthamoeba castellanii*, sendo este outro potencial reservatório (Abd, H., Johansson, T., Golovliov, I., Sandström, G. & Forsman, M. (2003). Na Europa, ainda não foi devidamente demonstrado o principal reservatório animal da doença (Figueiredo, 2007).

A doença surge em regiões de clima temperado do Hemisfério Norte, desde a América do Norte, Europa (particularmente nos países escandinavos) e Ásia (China, Coreia, Japão e Rússia), mas recentemente, a evidência da bactéria num doente na Austrália veio revelar que doença pode estar mais disseminada do que se pensa, não estando confinada apenas ao Hemisfério Norte (Oyston, Sjøstedt & Titball, 2004, Figueiredo, 2007).

A *F. tularensis* apresenta longa sobrevivência na água, em solos húmidos, palha e em cadáveres de animais, é resistente à dessecação mas apresenta sensibilidade ao calor e frio extremos, bem como à luz solar directa. Extremamente infecciosa, a bactéria pode causar doença num indivíduo pela inalação ou inoculação intradérmica de tão pouco como 10 a 50 organismos (Feldman, 2003, Sjøstedt, 2007, Nuncio, 2009).

As principais vias de transmissão são o contacto directo com tecidos ou fluídos de animais infectados, por picada de artrópodes vectores, por ingestão de água ou alimentos contaminados e por via inalatória. Estão descritos dois ciclos da doença, um terrestre e outro aquático. No primeiro, os hospedeiros vertebrados são os coelhos e lebres, nos quais ocorre a amplificação do agente patogénico geralmente com um quadro agudo ou fatal, enquanto as carraças, mosquitos e tabanídeos funcionam como vectores, perpetuando a doença no ciclo terrestre. No ciclo aquático, a bactéria circula nas populações de castores, ratos almiscarados e arvícolas. A *F. tularensis* pode ser disseminada a partir de carcaças desses animais, contaminando os cursos de água, como rios e barragens. O contacto directo com a água, o solo ou lamas pode ser fonte de infecção para outros animais. A interacção entre ambos os ciclos é ainda desconhecida (Figueiredo, 2007, Lopes de Carvalho et al., 2009). Outras formas de transmissão de tularémia consistem na comercialização de animais silvestres, capturados em zonas endémicas e transportados e vendidos para áreas geográficas não endémicas, como aconteceu com cães da pradaria provenientes dos EUA e que disseminaram a doença para a República Checa (Oyston et al., 2004, Lopes de Carvalho et al., 2009). Mas também em profissões que envolvam contacto

directo com carcaças e carne de lagomorfos, como aconteceu no primeiro surto ocorrido em Espanha. Adicionalmente, a ventilação e movimentação de terras, corte de arbustos, deposição de feno contaminado e o contacto directo com animais domésticos infectados (por exemplo, na tosquia de ovelhas) podem constituir factores de risco para a inalação de aerossóis, estando esta via muito associada a casos graves de tularémia pneumónica (Feldman, 2003, Lopes de Carvalho et al., 2009).

Os humanos, assim como outras espécies de mamíferos, nomeadamente cães, gatos, ovinos, bovinos e primatas, mas também predadores como raposas, coiotes, lobos, ursos, juntamente com aves, peixes, anfíbios e répteis são geralmente considerados hospedeiros acidentais (Feldman, 2003, Splettstoesser et al., 2005).

Em termos de distribuição da doença, a América do Norte é a única região onde ambos os tipos A e B de *Jellison* causam doença. Na Europa existem numerosos registos de surtos epidémicos de *F. tularensis*, tendo esta sido identificada em Espanha (em casos de manipulação de lebres e de lagostins de rio infectados), França, República Checa, Áustria, Alemanha, Suécia, Noruega, Finlândia, Bulgária, Ucrânia, Kosovo e Turquia (Núncio, 2009). Neste continente, os vectores mais importantes são os ixodídeos das espécies *Dermacentor reticulatus* e *Ixodes ricinus*, apesar dos mosquitos tomarem maior relevância como vectores em países como a Suécia e a Finlândia, sendo o meio aquático uma via de transmissão provável (Figueiredo, 2007). De facto, nos EUA, Suécia, Finlândia e Rússia a picada por um artrópode vector é uma via comum de transmissão de *F. tularensis*, enquanto que na Europa Central, essa via é responsável por uma pequena proporção de humanos infectados, sendo o contacto directo com animais infectados ou a ingestão de água e alimentos contaminados as formas mais frequentes de transmissão da doença (Petersen, Mead & Schriefer, 2009).

Em Portugal, a tularémia tem carácter endémico. A presença de artrópodes com capacidade vectorial como *I. ricinus*, *Dermacentor marginatum* e *D. reticulatus*, bem como potenciais reservatórios, como é o caso dos lagomorfos *Lepus granatensis* (lebre) e *O. cuniculus* (coelho-bravo), e dos roedores *Rattus* spp. (ratazana) e *Mus musculus* (rato doméstico) são factores epidemiológicos que apontam para a possibilidade de existência de tularémia em Portugal. Em 2001-2002, foi detectada uma prevalência de 8,9% da doença em 203 indivíduos assintomáticos rastreados no norte do país (Lopes de Carvalho et al., 2009). Foi também descrito, no distrito de Bragança, um caso de infecção num homem assintomático, que teria mantido contacto frequente com lagomorfos. Na mesma região, foi identificada a presença de *F. tularensis holarctica* numa carraça da espécie *D. reticulatus* de um ovino (Figueiredo, 2007, Lopes de Carvalho et al., 2009). Para além destes casos, pouco se conhece sobre a prevalência da tularémia no nosso país, em parte devido à falta de sistemas de vigilância ambiental eficazes e ao desconhecimento acerca dos reservatórios da doença e da caracterização das estirpes de *F. tularensis* autóctones.

### 1.1.5.2. Patogenia e Sintomas

A infecção por *F. tularensis* pode apresentar diferentes quadros clínicos, consoante a virulência do agente e do volume do inóculo, da porta de entrada, da extensão do envolvimento sistémico e da resposta imunitária por parte do hospedeiro, principalmente nos animais domésticos e nos humanos (Splettstoesser et al., 2005).

Após a entrada no hospedeiro, a bactéria multiplica-se e dissemina-se pela via hematogénea, provocando bacteriémia, ou pelos vasos linfáticos, causando linfadenite. Quando existe bacteriémia, as células fagocitárias do sistema reticuloendotelial eliminam os organismos invasores do sangue, mas a bactéria persiste intracelularmente. Ocorre a apoptose das células infectadas, libertando-se mais bactérias com potencial para infectar novas células. Podem surgir focos de necrose no fígado, baço, linfonodos, pulmões e medula óssea, podendo até coalescer e formar abscessos (Feldman, 2003, Figueiredo, 2007). A imunidade humoral desenvolve-se entre a segunda e terceira semanas após a infecção, com o aparecimento de IgG, IgM e IgA quase em simultâneo. No entanto, a imunidade celular parece combater melhor a bactéria, desenvolvendo-se logo na primeira semana depois da infecção (Feldman, 2003).

A presença de sinais clínicos de tularémia nos animais selvagens nem sempre é evidente ou sequer reconhecida, apesar de serem os mais afectados. Os surtos epidémicos em populações humanas são casuais e, geralmente, surgem associados a focos da doença nos animais silvestres (Oyston et al., 2004, Figueiredo, 2007, Lopes de Carvalho et al., 2009). Os animais são normalmente encontrados moribundos ou mortos, o que dificulta bastante o diagnóstico da doença. Os sintomas podem variar, desde infecções ligeiras com inflamação localizada, ulcerações e linfadenopatia regional, a infecções mais evidentes com febre, anorexia, pneumonia, diarreia e também linfadenopatia generalizada. A morte não é frequente e geralmente a doença é auto-limitante. As infecções subclínicas de tularémia em animais podem constituir um risco acrescido para detentores de animais exóticos ou capturados no meio silvestre (Splettstoesser et al., 2005). A doença clínica é reconhecida em lagomorfos e roedores silvestres, geralmente caracterizada por letargia e atonia numa fase terminal da tularémia. Naturalmente, os animais doentes e vulneráveis ficam mais susceptíveis à predação, facilitando a transmissão de *F. tularensis* aos predadores (Feldman, 2003).

A infecção em cães domésticos não é muito comum. No entanto, existem vários casos registados da ocorrência de tularémia, entre eles o de um cão de 13 meses de idade que ingeriu um coelho silvestre uma semana antes de se iniciarem os sinais agudos da doença, incluindo anorexia, piroxia e linfadenopatia com focos necróticos nas tonsilas. A doença progrediu de forma auto-limitante, apenas com tratamento de suporte. O perfil bioquímico e hematológico deste animal estava aparentemente normal, e o diagnóstico de tularémia foi confirmado com base num incremento em 4 vezes dos títulos de anticorpos de dois soros



consecutivos. Estudos realizados em cães domésticos inoculados experimentalmente demonstraram sinais de doença semelhantes aos de uma infecção natural. Os cães desenvolveram sintomas durante cerca de 5 dias, com febre, corrimentos mucopurulentos nasal e ocular e, nalguns casos, linfadenopatia regional. Nestes animais, a tularémia parece ter uma apresentação maioritariamente subclínica ou inaparente, enquanto que os gatos domésticos são mais susceptíveis, apresentando diversas manifestações clínicas (Feldman, 2003).

As principais apresentações clínicas descritas em humanos incluem as formas ulceroglandular, glandular, oculoglandular, orofaríngea, pneumónica, tífica e séptica. A ulceroglandular é a mais frequente, ocorrendo particularmente em caçadores, uma vez que está associada à manipulação de carcaças de animais infectados e a picadas de carraças e mosquitos vectores. A forma glandular é semelhante, mas com ausência de lesões na pele. A forma oculoglandular surge por contaminação directa do olho, provocando infecção da mucosa conjuntiva. A ingestão de água ou comida contaminadas pode originar uma forma orofaríngea, assim como a inalação de aerossóis infectados. O quadro pneumónico tem, geralmente, origem na inalação de aerossóis contaminados, mas também pode ser consequência da disseminação hematogénea da bactéria a partir de outro órgão do organismo. Assume um carácter sistémico, com sinais inespecíficos de doença respiratória, muitas vezes com uma evolução grave. As formas tífica e séptica resultam, normalmente, da ingestão de água ou alimentos contaminados, revelando sinais gastrointestinais intensos e septicémias. Sem tratamento, a doença pode progredir para insuficiência renal, choque e mesmo a morte (Lopes de Carvalho et al., 2009).

#### **1.1.5.3. Diagnóstico**

Na suspeita clínica de tularémia, devem ser colhidas amostras biológicas adequadas e enviadas para um laboratório competente (nível 3 de bio-segurança ou BSL-3) (Feldman, 2003, Lopes de Carvalho et al., 2009). Este deve ser notificado previamente de que irá receber amostras de *F. tularensis*, por um lado, pela elevada infecciosidade do agente, e por outro, para preparar a recepção do material e o respectivos meios a disponibilizar para o diagnóstico. O tipo de amostras a retirar depende das formas clínicas de tularémia, mas em geral devem incluir esfregaços de lesões ou zaragatoas, sangue inteiro, urina, biópsias de tecido, aspirados ou raspagens (de úlceras, linfonodos, córnea ou outros tecidos afectados) e amostras das vias respiratórias (expectoração, lavagens bronquial e pleural). Aquando da colheita de amostras de surtos epizooticos ou no contexto de investigações epidemiológicas, devem ser incluídos vectores, carcaças ou cadáveres, fezes dos hospedeiros e amostras de água (Speltstoesser et al., 2005). Contudo, a padronização de protocolos para analisar este tipo de amostras ainda não foi estabelecida, o que dificulta a tarefa de diagnosticar a doença.

O diagnóstico definitivo de tularémia em cães requer a detecção de títulos crescentes de anticorpos (até 4 vezes superior à primeira colheita analisada), ou a presença da bactéria num tecido de biopsia por cultura, imunofluorescência directa (IF) ou PCR. Acredita-se que a tularémia esteja subdiagnosticada nos cães, uma vez que a doença é auto-limitante e ocorre de forma subclínica na maior parte dos casos. Em regiões endémicas, a tularémia deve fazer parte dos diagnósticos diferenciais de cães que apresentem febre, com ou sem linfadenomegália (Figueiredo, 2007).

A microscopia de fluorescência associada à utilização de anticorpos, monoclonais ou policlonais, pode ser usada na identificação presuntiva de *F. tularensis*. A imunohistoquímica, a microscopia imuno-electrónica e a imunofluorescência com anticorpos específicos constituem outras técnicas valiosas para a detecção da bactéria em amostras de expectoração, pús e tecidos fixados com formalina ou impregnados em parafina. Outros métodos de ELISA ou de imunocromatografia (IC) também permitem detectar antígenos no soro, urina e órgãos (baço, fígado e pulmões) provenientes de animais infectados ou mesmo de amostras ambientais (água e lamas) (Splettstoesser et al., 2005).

A bactéria pode ser cultivada *in vitro* em meios de cultura sólidos ou líquidos, embora seja um organismo fastidioso, dependendo da presença de cisteína para crescer. Ainda que o crescimento primário de *F. tularensis* possa ocorrer em meios não enriquecidos (agar de chocolate, por exemplo), os meios enriquecidos melhoram a taxa de recolha de isolados primários e são necessários para a subcultura de colónias suspeitas. O meio de agar de cisteína enriquecido com sangue achocolatado (CHAB) é o meio mais recomendado para a cultura, pois permite realizar uma identificação presuntiva de *F. tularensis*, que se apresenta como colónias verde opalescente, brilhantes às 24-48 horas (Lopes de Carvalho et al., 2009). A bactéria cresce também em meios líquidos adequados, como o meio modificado de Mueller-Hinton, embora de forma lenta, decorrendo 3 a 7 dias quando agitado, ou 10 dias sem agitação do meio. Adicionalmente, tanto as placas como os meios líquidos devem permanecer incubadas durante 7 a 10 dias, à temperatura de 35-37°C, com taxas de CO<sub>2</sub> elevadas (5%) para estimular o crescimento das bactérias (Splettstoesser et al., 2005, Figueiredo, 2007). Dado o lento crescimento de *F. tularensis*, amostras recolhidas de locais não estéreis (lavagens traqueais, zaragatoas de lesões ou expectoração) ou ambientais (carcaças e fezes, por exemplo) tornam-se morosas, pelo que a adição de antibióticos ao meio de cultura contribui para a supressão de flora bacteriana e fúngica concorrente, aumentando as hipóteses de isolamento da bactéria em questão. O isolamento a partir de amostras de sangue de indivíduos com apresentações pneumónicas, tíficas ou septicémicas tem revelado melhores resultados do que noutras formas de tularémia. Nos casos em que se espera uma contaminação considerável das amostras (amostras *post-mortem* de animais, fezes e amostras ambientais), ou quando a cultura directa teve insucesso, as

amostras devem ser inoculadas em ratos ou cobaias, obtendo-se resultados geralmente dentro de uma semana (Splettstoesser et al., 2005).

A identificação microbiológica de *F. tularensis* também pode ser efectuada por análise imunológica, através de um IB, usando para isso anticorpos monoclonais ou anti-soros específicos para a bactéria. Adicionalmente, a IF é adequada para a identificação das colónias, bem como para a detecção específica do agente em amostras clínicas. A aglutinação em placa (AP) com a utilização de anti-soros ou anticorpos monoclonais permite identificar a espécie (Splettstoesser et al., 2005).

Dentro dos métodos moleculares, existe uma bateria de ensaios que permitem a detecção, identificação e tipagem das estirpes de *F. tularensis*, nomeadamente o PCR convencional, o PCR em tempo real e os sistemas de electroforese em géis de agarose. Estas técnicas evitam a manipulação directa da bactéria, uma vantagem acrescida quando se trata de agentes com elevado potencial infeccioso (Figueiredo, 2007). Os genes que codificam a proteína *tul4* da membrana exterior de *F. tularensis* foram os primeiros a ser usados nas técnicas de PCR para detectar o agente em amostras de sangue, aerossóis e tecidos de ratos infectados experimentalmente. Apesar de apresentarem falta de sensibilidade quando comparadas com o PCR em tempo real, estes protocolos mostraram vantagens em relação à cultura de amostras de sangue de animais infectados experimentalmente (Splettstoesser et al., 2005). A aplicação de outras formas de extracção de ADN, em combinação com a utilização de *nested*-PCR para uma proteína de 43 kDa da membrana exterior, a *fopA*, melhorou o limite de detecção em amostras de sangue (Splettstoesser et al., 2005, Lopes de Carvalho et al., 2009). O uso de PCR para *tul4*, como referido, revelou ser superior a outros testes imunológicos na detecção directa de *F. tularensis* em soros e tecidos de lebres com infecção natural. Estas técnicas de PCR também foram bem sucedidas na detecção da bactéria em carraças e amostras ambientais (carcaças de roedores e água contaminada) (Splettstoesser et al., 2005). Os testes de PCR em tempo real vieram contribuir para a melhoria dos resultados obtidos, quer em termos de rapidez quer de sensibilidade. Sistemas como o TaqMan<sup>TM</sup> para *fopA* são específicos a nível do género e provaram ser adequados para a detecção de ADN de *F. tularensis* em tecidos de ratos. A adaptação do TaqMan<sup>TM</sup> para *fopA* e *tul4* para termocicladores de PCR provou ser específica quanto à espécie, quando aplicada em órgãos de ratos infectados. Outro ensaio múltiplo de PCR TaqMan<sup>TM</sup> em tempo real, com os genes que codificam *tul4*, *fopA*, *ISFtu2* e *23 kDa* demonstrou ser mais sensível do que a cultura, quando usado em amostras ambientais contaminadas ou em roedores infectados experimental ou naturalmente (Splettstoesser et al., 2005, Lopes de Carvalho et al., 2009). No entanto, a utilização destes métodos moleculares carece ainda de avaliação e padronização em amostras de humanos (Splettstoesser et al., 2005). Existem técnicas de genotipagem com utilidade para distinguir entre subespécies e estirpes de *F. tularensis*. A genotipagem por electroforese em gel de agarose (*pulsed-field gel*

*electrophoresis*), por *amplified fragment length polymorphism* (AFLP) e por sequenciação do gene 16S ARNr mostraram vantagens apenas na distinção entre subespécies de *F. tularensis*. Já as análises de *short-sequence tandem repeats* (SSTR) ou *variable number tandem repeats* (VNTR) mostraram ser valiosas na discriminação de estirpes individuais. A aplicação de *microarrays* na análise de ADN pode ainda ajudar na identificação de variações genéticas e de marcadores de virulência e de patogenicidade (Splettstoesser et al., 2005, Lopes de Carvalho et al., 2009).

A sorologia é, provavelmente, o meio mais comum de obter um diagnóstico clínico de tularémia, em humanos. As razões que apontam para isto incluem a natureza altamente infecciosa do agente, as dificuldades inerentes ao crescimento da bactéria em meio de cultura, que é fastidioso e moroso, mas também a falta de standardização e avaliação dos protocolos de PCR. Os métodos sorológicos também são úteis para estudos epidemiológicos em humanos e animais, ou na monitorização da subida de anticorpos específicos após a administração de uma vacina (Splettstoesser et al., 2005). Existem vários testes disponíveis para a detecção de anticorpos de *F. tularensis*, como a aglutinação em tubo, microaglutinação, hemaglutinação, ELISA, IB (Lopes de Carvalho et al., 2009) e imunocromatografia rápida (ICR) (Berdal et al., 2000). O teste de aglutinação (reação de Widal) foi o mais usado durante décadas, mas recentemente surgiram algumas modificações do mesmo, designadamente a microaglutinação, com melhores resultados (Splettstoesser et al., 2005). As técnicas de aglutinação detectam infecções causadas pelas subespécies *F. tularensis tularensis* e *F. tularensis holarctica* (Lopes de Carvalho et al., 2007). Os resultados obtidos são normalmente negativos na primeira semana, começando a subir com a evolução da doença e atingindo um pico após 4 a 5 semanas de infecção. A microaglutinação chega a ser 100 vezes mais sensível do que o método de aglutinação em tubo (Lopes de Carvalho et al., 2009), para além de ser de execução mais simples, rápida e económica, e de fácil interpretação (Figueiredo, 2007). Os valores limite de positividade (*cut-off*) nestes testes variam consoante os laboratórios onde são realizados, não existindo valores padrão para canídeos, apesar de ter sido referido um *cut-off* de 1:20 na aglutinação em placa, em lobos (Zarnke, Ver Hoef & DeLong, 2004). Os ELISA provaram ser mais sensíveis que a aglutinação, e têm a vantagem de poder determinar separadamente diferentes classes de anticorpos (IgM, IgG e IgA). Uma investigação efectuada na Noruega revelou que ICR e ELISA foram úteis na detecção de *F. tularensis* em amostras clínicas e de água contaminada, mas que a primeira técnica teve vantagens por ser mais rápida (15 minutos vs. 4 horas) e fácil de executar e por requerer pouco equipamento adicional. Os mesmos autores realçaram ainda a versatilidade da ICR frente ao PCR, mesmo sendo um teste menos sensível que o último (Berdal et al., 2000). Uma variedade de antígenos pode ser usada em provas de aglutinação, ELISA e WB, originando resultados com sucesso 5 a 10 dias após o aparecimento de sintomas ou depois da vacinação. Contudo, as reacções

cruzadas com antígenos de outras bactérias (*Brucella* spp., *Proteus* OX19 e *Yersinia* spp.) podem ocorrer, originando resultados falso positivos. A minimização da ocorrência de reações cruzadas pode ser conseguida através do tratamento de soros com ditiotreitol (DDT) (Lopes de Carvalho et al., 2009). A longa persistência de anticorpos específicos para *F. tularensis* após uma infecção está sob investigação, uma vez que se desconhece ainda o papel das diversas subclasses de imunoglobulinas no diagnóstico da tularémia aguda. Actualmente, a aplicação de testes em duas etapas, pela combinação de um teste de rastreio, como ELISA, com a adaptação de um teste de IB, pode ser uma mais valia para o diagnóstico da doença (Splettstoesser et al., 2005, Lopes de Carvalho et al., 2009).

#### 1.1.5.4. Tratamento

Os estudos *in vitro* da sensibilidade de *F. tularensis* a antibióticos revelaram que esta é susceptível à ceftriaxona, ceftazidima, rifampina e a antibióticos do grupo carbapenem e a certos macrólidos, contudo, ainda não há dados clínicos que recomendem o uso destes fármacos na clínica corrente. Uma vez que *F. tularensis* é capaz de produzir  $\beta$ -lactamase, a mesma revela resistência aos fármacos  $\beta$ -lactâmicos (Feldman, 2003). Adicionalmente, sabe-se que a subespécie *F. tularensis holarctica* é naturalmente resistente à eritromicina (Oyston et al., 2004).

Os aminoglicosídeos, nomeadamente a estreptomicina, têm sido considerados os antibióticos de eleição para o tratamento da tularémia humana, pela sua eficácia clinicamente comprovada (Feldman, 2003, Oyston et al., 2004, Figueiredo, 2007, Lopes de Carvalho et al., 2009). Nos casos de meningite provocada por *F. tularensis*, como os aminoglicosídeos perdem a capacidade de penetrar a barreira do SNC e no LCR, está aconselhada a associação de estreptomicina com cloranfenicol ou de gentamicina com doxiciclina. A gentamicina também pode ser administrada, embora haja registo de recidivas e de taxas de insucesso do tratamento superiores (Lopes de Carvalho et al., 2009). Em alternativa aos aminoglicosídeos, as tetraciclina e o cloranfenicol são outras opções na terapêutica da tularémia. Contudo, como a sua acção é apenas bacteriostática, as recaídas e o insucesso nos tratamentos primários são comuns. Adicionalmente, requerem uma duração de administração de pelo menos 14 dias para minimizar essas situações e em doses mais altas (Feldman, 2003, Oyston et al., 2004, Lopes de Carvalho et al., 2009). O cloranfenicol é muitas vezes evitado pela sua elevada toxicidade. As fluoroquinolonas, como a ciprofloxacina, também parecem ser eficazes na terapêutica oral da tularémia, segundo alguns testes de sensibilidade realizados *in vitro* com as subespécies *F. tularensis tularensis* e *F. tularensis holarctica* (Oyston et al., 2004, Lopes de Carvalho et al., 2009). De acordo com dados microbiológicos e evidências clínicas publicadas, a ciprofloxacina é provavelmente o antibiótico de escolha no tratamento de casos não complicados de tularémia, podendo ser usada como terapêutica de segundo plano em formas severas da

doença. Em situações de infecção de populações em grande escala (bioterrorismo, por exemplo) está preconizado o tratamento oral com fluoroquinolonas, particularmente ciprofloxacina, ou doxiciclina em alternativa, como a melhor estratégia de tratamento de tularémia (Feldman, 2003, Oyston et al., 2004).

No que respeita às espécies animais, foram extrapolados tratamentos a partir da medicina humana. Deste modo, a Tabela 5 reúne uma série de antibióticos, alguns mencionados acima, com aplicação nos cães domésticos, designadamente a gentamicina, doxiciclina, cloranfenicol, enrofloxacin e ciprofloxacina. Na bibliografia, foi descrita uma terapêutica num cão doméstico infectado, ao qual foi administrada doxiciclina 5 mg/kg PO SID durante 14 dias e fluidoterapia de suporte com Lactato de Ringer, tendo o animal recuperado clinicamente. Noutro caso clínico, um cão doméstico recuperou 5 dias após o início do tratamento de suporte, sem terapêutica antibiótica específica (Figueiredo, 2007), o que suporta a ideia de que a doença é auto-limitante nesta espécie.

**Tabela 5** – Antibióticos recomendados para o tratamento da tularémia canina.

Substância activa	Dose (mg/kg)	Frequência de administração	Via de administração	Observações
<b>Gentamicina</b>	6,6* 2 <sup>¶</sup>	SID TID	IM, IV, SC IM, SC	10 dias de tratamento; ajustar a dose em casos de insuficiência renal e em pacientes geriátricos
<b>Doxiciclina</b>	5* 5-10 <sup>¶</sup>	SID BID	PO PO, IV	14 dias de tratamento
<b>Cloranfenicol</b>	100, depois 50* 25-50 <sup>§</sup> 50 <sup>¶</sup>	TID SID/BID TID	PO, IM PO, IM, IV, SC PO, IM, IV, SC	14 dias de tratamento
<b>Enrofloxacin</b>	2,5* 5-10 <sup>§</sup>	BID SID	PO, IM PO, IM, IV, SC	10 dias de tratamento; contra-indicada em cadelas gestantes
<b>Ciprofloxacina</b>	5-15 <sup>¶</sup>	BID	PO	Contra-indicada em cadelas gestantes

(\*Feldman, 2003, <sup>§</sup>Shaw, 2005, <sup>¶</sup>Allen, Dowling, Smith, Pasloske & Woods, 2005)

#### 1.1.5.5. Prevenção

Existem diversos ofícios com risco acrescido de contrair tularémia, tais como veterinários, técnicos de laboratório, agricultores ou produtores de animais (principalmente de lagomorfos e ovinos), caçadores e profissões em que se manipulam carnes ou carcaças de animais (particularmente nos matadouros). Nestes casos, a utilização de luvas de protecção e a desinfecção dos equipamentos após o seu uso é uma mais valia para a prevenção da doença. A detecção de animais e pessoas infectadas com *F. tularensis*, assim como a observação de mortalidade anormal em populações de roedores e lagomorfos deve ser declarada às autoridades de saúde competentes. Esta bactéria tem um elevado potencial como agente de bioterrorismo (classe A dos agentes biológicos do CDC) (Splettstoesser et al., 2005), razão pela qual devem ser rapidamente investigados quaisquer surtos da doença

em animais e humanos, pelas autoridades de saúde pública. O carácter infeccioso da *F. tularensis* exige que os laboratórios que processem amostras clínicas ou suspeitas de serem infectantes estejam equipados com os níveis de bio-segurança 3 (BSL-3) (Feldman, 2003, Lopes de Carvalho et al., 2009). Até há pouco tempo, a vacinação com uma vacina viva atenuada esteve disponível para técnicos de laboratórios e outros grupos de risco (Feldman, 2003, Oyston et al., 2004), no entanto, o desconhecimento exacto da base de atenuação do agente e dos processos pato-fisiológicos da vacina, com a possibilidade de reversão total ou parcial da virulência, levaram à descontinuidade do uso desta vacina. Muitos dos estudos de investigação acerca da biologia de *F. tularensis* estão focados para a produção de uma vacina mais segura e eficaz (Oyston et al., 2004).

## **1.2. Doenças causadas por nemátodes**

### **1.2.1. Dirofilariose canina**

#### **1.2.1.1. Etiologia e Epidemiologia**

A filarioses são doenças causadas por nemátodes da Superfamília Filarioidea, com patogenias diversas desde as filarioses linfática, subcutânea e cardiopulmonar às filarioses ectópicas. A dirofilariose canina, ou “verme do coração”, é uma das mais importantes e amplamente distribuídas geograficamente, causada pelo parasita *Dirofilaria immitis* (Família Onchocercidae). Este nemátode localiza-se principalmente nas artérias pulmonares e no coração direito de cães e, menos frequentemente, de gatos e furões. A infecção pode ocorrer noutras espécies, como canídeos (coiotes) (Sacks, Woodward & Colwell, 2003) e gatos silvestres, leões marinhos, focas e ainda nos humanos, apesar de estes serem considerados hospedeiros aberrantes ou acidentais, uma vez que os parasitas raramente atingem a maturação para completar o seu ciclo biológico. Existem também relatos de infecções por *D. immitis* em cavalos, castores, ursos, guaxinins, pandas vermelhos, entre outras espécies de animais silvestres (Ferasin & Knight, 2005).

O ciclo biológico é indirecto, pelo que requer um hospedeiro definitivo (canídeo) onde o parasita se reproduz, e um hospedeiro intermediário (mosquito), no qual ocorrem dois estádios larvares. Os mosquitos fêmeas infectam-se com microfilárias quando se alimentam num canídeo infectado, tornando-se vectores das larvas infectantes de terceiro estágio (L3) quando se alimentam num novo hospedeiro definitivo. A doença transmite-se assim através da picada de mosquitos culicídeos dos géneros *Anopheles*, *Culex* e *Aedes*. Mesmo que a população de mosquitos seja abundante, a transmissão de *D. immitis* só acontece se as temperaturas acumulativas forem suficientemente altas para as formas larvares se desenvolverem até larvas infectantes L3 (Sacks et al., 2003). Vários factores determinam o risco de transmissão da doença, aumentando a receptividade do hospedeiro definitivo, tais

como o modo de vida dos cães, a idade e o sexo. Cães errantes, que vivam no exterior ou que exerçam funções de pastoreio ou caça estão mais expostos aos mosquitos. Entre os 3 e os 7 anos de idade verifica-se um maior número de casos de dirofilariose canina, assim como nos machos. Os parasitas são capazes de viver até cerca de 7,5 anos no hospedeiro definitivo, por isso, a sua sobrevivência depende, em parte, da sobrevivência do próprio hospedeiro (Sacks et al., 2003).

A dirofilariose está distribuída mundialmente e a sua prevalência varia de acordo com as populações de canídeos, a presença de vectores e o clima. Zonas tropicais e temperadas do globo favorecem a ocorrência de mosquitos e o desenvolvimento dos estádios larvares nos mesmos (Otranto, Capelli & Genchi, 2009). Uma investigação (Sacks et al., 2003) de nove anos avaliou o modo como a temperatura, a precipitação e a abundância de vectores podem influenciar a transmissão da dirofilariose na costa norte da Califórnia. Nesse estudo, os autores defendem que, para além da temperatura condicionar a transmissão de *D. immitis*, a precipitação é também uma determinante fundamental, pois possui uma forte correlação positiva com a quantidade de vectores e, simultaneamente, com a transmissão da doença. Os mesmos investigadores transpõem esses resultados para regiões endémicas como os ecossistemas Mediterrânicos da Europa, a Australásia, a América do Sul e África, realçando a importância do tratamento preventivo dos cães em anos com verões seguidos de grande precipitação.

A dirofilariose distribui-se por toda a América, sul da Europa (Tabela 6), África, Ásia e Austrália, e nos países não endémicos pode ser diagnosticada em animais que viajaram ou passaram por regiões endémicas. Na Austrália, também as raposas (*V. vulpes*) demonstraram uma prevalência de 6,4% de dirofilariose, na região de Melbourne (Marks & Bloomfield, 1998).

**Tabela 6** – Prevalências de dirofilariose em canídeos e humanos em países do sul da Europa.

País	Prevalência de dirofilariose (%)			
	Canídeos		Humanos	
Espanha	8-36,7 20-36	no continente* nas ilhas*	10-11,6	no continente <sup>‡§</sup>
Itália	50-80*		32,3 <sup>§</sup>	
Portugal	16,7	Ribatejo*		
	16,5	Alentejo*		
	12	Algarve*		
	9-51,2	Setúbal <sup>¶</sup>		
	13	Coimbra <sup>†</sup>		
	30	Ilha da Madeira*		

\*Genchi, Kramer & Prieto, 2001, <sup>‡</sup>Morchón, Moya, González-Miguel, Montoya & Simón, 2009, <sup>§</sup>Genchi, Simón & Kramer, 2005, <sup>¶</sup>Meireles, n.d., <sup>†</sup>Sousa, Pimentel, Silva & Madeira de Carvalho, 2008.



### 1.2.1.2. Patogenia e Sintomas

A dirofilariose canina é principalmente uma doença cardiopulmonar. Os nemátodes adultos alojam-se nas artérias pulmonares, provocando a proliferação da camada íntima e, como consequência, a diminuição do lúmen dos vasos ou mesmo a sua obstrução, embora esta seja rara. A extensão e severidade das lesões dependem do número e da localização dos vermes, observando-se uma tendência para cargas parasitárias maiores nas artérias dos lobos caudais (Ferasin & Knight, 2005). Lesões extensas nas artérias pulmonares aumentam a permeabilidade dos vasos, permitindo a formação de edema periarterial e de infiltrados celulares, intersticial e alveolar, culminando por vezes em fibrose pulmonar irreversível. Por outro lado, as lesões endoteliais promovem a agregação plaquetária, o que pode originar tromboembolismo pulmonar (TEP), uma sequela comum da dirofilariose. A morte dos parasitas adultos, de forma espontânea ou induzida por tratamentos adulticidas, constitui também uma causa de TEP (Genchi, Kramer & Prieto, 2001, Ferasin & Knight, 2005). Infecções severas, onde existe um grande número de parasitas adultos em maturação, podem provocar migrações retrógradas da artéria pulmonar para o ventrículo direito do coração, átrio direito e veia cava. Nestes casos, a insuficiência da válvula tricúspide associada a hipertensão pulmonar contribui para uma insuficiência cardíaca direita, com os efeitos congestivos que a acompanham, como dilatação jugular, congestão hepática e ascite. Paralelamente, pode ocorrer hemólise e hemoglobinemia por lesões provocadas na parede dos eritrócitos que atravessam as massas intravasculares de parasitas (Ferasin & Knight, 2005). Todos estes fenómenos, insuficiência da tricúspide, insuficiência cardíaca direita com hepatomegália, fraco débito cardíaco, hemólise intravascular com hemoglobinemia e hemoglobinúria, quando presentes são referidos como a síndrome da veia cava (Genchi et al., 2001, Ferasin & Knight, 2005), principalmente pela localização das formas adultas nesta veia. Situações graves desta síndrome também se caracterizam pela presença de vermes adultos na veia cava e ocorrência de tromboembolismos acompanhados por CID. Para além dos sintomas cardiopulmonares, a dirofilariose pode ainda provocar sequelas a outro nível, como glomerulonefrite por deposição de complexos imunes, em que existe nefropatia com perda de proteína, hipoalbuminemia e, eventualmente, redução da concentração plasmática de antitrombina III, o que pode exacerbar a evolução de TEP. Adicionalmente, embora raros nos cães, podem acontecer casos de dirofilariose ectópica, dos quais já foi registada a presença de *D. immitis* nos olhos, artérias cerebrais e ventrículos laterais do SNC, artérias sistémicas e no tecido subcutâneo (Ferasin & Knight, 2005).

Apesar da patogenia da doença poder ser algo complexa, a dirofilariose também pode ser completamente assintomática. Todavia, os sinais clínicos geralmente manifestam-se quando a carga parasitária é elevada ou quando a resposta alérgica aos vermes é significativa. Normalmente, a doença tem uma evolução lenta e gradual, sendo a tosse o sinal mais

frequente, seguido de taquipneia e dispneia, intolerância ao exercício físico, perda de peso e síncope (Genchi et al., 2001, Ferasin & Knight, 2005). Em casos graves, a hemoptise pode representar um sinal de ruptura de artérias pulmonares. Os sinais de insuficiência cardíaca direita, nomeadamente dilatação da jugular, hepatomegália, ascite e marcada intolerância ao exercício, são bastante típicos. Nestes casos, uma simples auscultação torácica pode detectar um sopro cardíaco sistólico. A síndrome da veia cava caracteriza-se por anorexia, perda de peso, alterações na respiração, hemoglobinúria secundária à hemólise intravascular, sinais de insuficiência cardíaca direita e possível CID. Localizações ectópicas dos parasitas podem apresentar-se como claudicação dos membros inferiores e parésia dos mesmos. Contudo, a dirofilariose nem sempre progride de forma lenta e alguns animais podem manifestar sinais agudos da doença.

Apesar dos humanos serem hospedeiros acidentais, há registos frequentes de infecções por *D. immitis*, o que demonstra o risco zoonótico da dirofilariose. As lesões parasitárias tendem a ser benignas e são causadas por um único nemátode, que raramente atinge a maturidade sexual. O parasita pode causar dirofilariose pulmonar, cujos sinais se restringem muitas vezes a pequenos nódulos isolados no parênquima pulmonar, numa radiografia torácica. Ainda assim, existem raros casos de dirofilariose extrapulmonar e de microfilarémia em humanos (Ferasin & Knight, 2005).

#### 1.2.1.3. Diagnóstico

O diagnóstico da dirofilariose deve basear-se na existência de exposição prévia a mosquitos, numa região onde a presença de *D. immitis* seja provável, e não apenas nos sinais clínicos. Um perfil laboratorial de rotina é, muitas vezes, insuficiente para obter um diagnóstico etiológico, embora a presença de eosinofilia e basofilia ou de valores superiores de enzimas hepáticas, ureia e creatinina no sangue possam sugerir uma infecção parasitária. A imagiologia constitui um meio complementar de diagnóstico bastante útil, tornando possível a observação radiográfica de alterações a nível das artérias pulmonares, com dilatação e tortuosidade das mesmas, particularmente nos lobos caudais dos pulmões. Pode verificar-se também dilatação do coração direito, da veia cava caudal, bem como hepatomegália e a presença de ascite no abdómen do animal. A técnica de angiografia raramente é usada, não só pelos riscos que o seu procedimento envolve, mas também por estar disponível em poucas clínicas. A ecocardiografia permite visualizar os nemátodes adultos na artéria pulmonar e coração direito, e pode ainda detectar alterações estruturais do coração ou insuficiência da tricúspide nos casos mais severos. Adicionalmente, um ECG pode revelar fibrilação atrial e desvio do eixo eléctrico para a direita (Genchi et al., 2001).

O diagnóstico parasitológico pela pesquisa e identificação de microfílaras pode ser obtido por meio de várias técnicas, nomeadamente a observação em “gota a fresco”, a técnica modificada de Knott, a filtração através de membranas de polycarbonato de 3 a 5 µm, e pela

distribuição somática das zonas de actividade das fosfatases ácidas nas microfilárias. A “gota a fresco” é muito fácil e simples de executar, bastando apenas depositar uma gota de sangue fresco numa lâmina e observar ao microscópio óptico. Apesar de rápido e de não ser dispendioso, o teste da “gota a fresco” tem baixas sensibilidade e especificidade, principalmente quando a taxa de microfilaremia é baixa. Para aumentar a sensibilidade, a técnica modificada de Knott é mais fiável e permite a identificação morfológica da espécie de microfilária presente. Um estudo (Ranjbar-Bahadori, Eslami & Bokaic, 2007) efectuado em 110 cães provenientes do Irão revelou taxas de cerca de 86% e 92% para a sensibilidade e especificidade da técnica modificada de Knott, respectivamente, considerando este um teste quase tão fiável como os testes de antigénio actualmente disponíveis. Existe uma variedade de testes imunológicos que detectam a presença de antigénios no sangue, plasma ou soro, que consistem em técnicas de ELISA, fluxo lateral (IC), imunomigração rápida (RIM) ou aglutinação. Os testes de antigénio identificam proteínas específicas libertadas pelo aparelho reprodutor das fêmeas adultas de *D. immitis*, o que significa que detectam infecções ocultas (amicrofilaremia). Esta é uma vantagem importante, já que até 30% dos cães infectados apresentam amicrofilaremia, quer por possuírem parasitas adultos do mesmo sexo, por terem desenvolvido uma reacção imunitária considerável contra as microfilárias, ou por lhes ter sido administrado um microfilaricida (Genchi et al., 2001). A sensibilidade dos testes aproxima-se dos 98%, mas é francamente reduzida para cerca de 35% em cães infectados com cargas parasitárias baixas (Ferasin & Knight, 2005). A especificidade está perto dos 100% para todos os *kits* disponíveis no mercado, não existindo reacções cruzadas com outros parasitas (Genchi et al., 2001), no entanto, títulos baixos de antigénio e falsos negativos são comuns em casos com carga parasitária reduzida, quando apenas estão presentes fêmeas imaturas, em infecções causadas unicamente por machos, ou se o teste foi aplicado durante o período pré-patente da doença. É de notar que os testes de antigénios são mais fiáveis se realizados pelo menos 5 meses após a infecção, de modo a facultar a acumulação de antigénios em concentração suficiente no sangue circulante. Também é importante saber se o animal foi ou está a ser tratado com adulticidas, uma vez que os níveis de antigénio deixam de ser detectáveis 8 a 12 semanas após o início da terapêutica. Wang (1998) realizou um estudo comparativo entre a técnica de aglutinação de sangue inteiro e um teste comercial ELISA, onde obteve valores de sensibilidade e especificidade (83,9% e 100,0%, respectivamente) superiores para o ELISA, comparativamente aos valores para a aglutinação (71,7% e 85,1%, respectivamente). O mesmo autor sugere que a aglutinação, apesar de ser mais simples e rápida, é menos eficiente e fiável que o ELISA, e pouco adequada na detecção de infecções em populações caninas com baixas prevalências de *D. immitis*. Outras técnicas, usadas em rastreios de rotina, detectam a presença de anticorpos, fornecendo informação sobre a exposição prévia a *D. immitis*, mas não necessariamente acerca duma infecção corrente. Por este motivo, os

testes de anticorpos são mais úteis para excluir uma possível infecção. Por outro lado, a sua baixa especificidade, devida a reacções cruzadas em cães infectados com parasitas intestinais ou *Dipetalonema reconditum*, fez com que deixassem de ser usados em cães (Wang, 1998). No domínio dos métodos moleculares, o PCR é muito sensível e específico na identificação de vermes adultos e imaturos, particularmente em espécies de hospedeiros acidentais, ainda que não esteja amplamente disponível. Actualmente, a utilização de anticorpos monoclonais para detectar antígenos circulantes de adultos de *D. immitis* constitui a alternativa preferível para o diagnóstico e monitorização da dirofilariose (Wang, 1998), principalmente se complementada pela pesquisa de microfilárias.

#### 1.2.1.4. Tratamento

O tratamento da dirofilariose não é simples nem totalmente seguro. Não existe nenhum fármaco que seja simultaneamente eficaz para eliminar adultos e microfilárias. Por esta razão, geralmente realiza-se uma terapêutica sequencial com um adulticida e um microfilaricida (Tabela 7). É importante avaliar o quadro clínico do animal antes de iniciar qualquer tratamento, de modo a fazer-se a escolha mais adequada do protocolo terapêutico e estabelecer um prognóstico correcto. Cães assintomáticos ou com um quadro clínico moderado normalmente têm um bom prognóstico, só com a administração de adulticidas e, por vezes, apenas com uma monitorização regular. Casos mais graves têm um prognóstico reservado ou mau, particularmente se existir síndrome da veia cava com hipertensão pulmonar severa. Nestas situações, o risco de tromboembolismo por administração de adulticidas é elevado, o que dificulta a escolha de um protocolo de tratamento seguro (Ferasin & Knight, 2005). Pode ser necessário remover cirurgicamente os parasitas adultos quando a síndrome da veia cava é bastante grave. Depois de cerca de 4 semanas da recuperação dos tratamentos adulticida e sintomático, deve iniciar-se a administração de microfilaricidas. Aconselha-se a monitorização do animal, pois a morte súbita de grande número de microfilárias pode desencadear reacções anafiláticas e choque, geralmente sinalizados por letargia, mucosas pálidas, taquicardia, vômitos, diarreia e ptialismo, 4 a 8 horas após a primeira dose medicamentosa (Ferasin & Knight, 2005).

**Tabela 7** – Principais adulticidas usados no tratamento da dirofilariose canina. (adaptado de Ferasin & Knight, 2005)

Substância activa	Dose recomendada	Observações
<b>Melarsomina</b>	2,5 mg/kg SID, IM duas doses*	eficácia contra L5 e adultos; menor efeito nefrotóxico e hepatotóxico; dispendioso
<b>Tiacetarsamida sódica</b>	2,2 mg/kg BID, IV durante 2 dias	eficácia contra adultos; nefrotóxico e hepatotóxico; infiltração perivascular causa lesão dos tecidos

\* Em infecções graves deve estabilizar-se o animal e aplicar uma dose de 2,5 mg/Kg, após 1 mês administram-se duas doses de 2,5 mg/Kg, com 24h de intervalo.

### 1.2.1.5. Prevenção

A transmissão da dirofilariose depende essencialmente da presença dos seus vectores na região onde residem os hospedeiros. Considerando que os vectores necessitam de condições climatéricas favoráveis ao seu desenvolvimento, a quimioprofilaxia justifica-se principalmente nos meses do ano em que a ocorrência dos mosquitos é maior, geralmente, entre os meses de Maio a Outubro. A quimioprofilaxia é recomendada a todos os cães residentes em zonas endémicas, durante o período de maior probabilidade de transmissão da doença, embora alguns autores defendam que deva ser continuado durante todo o ano. Animais que vivam em regiões não endémicas são aconselhados a receber tratamento profilático se viajarem para áreas onde a dirofilariose prevalece, uma vez que podem ser mais susceptíveis à infecção (Ferasin & Knight, 2005). Antes de se iniciar a quimioprofilaxia, deve sempre excluir-se a hipótese de já existir infecção por *D. immitis*, através da realização de testes de detecção de antígenos e de microfilárias. Os quimioprofiláticos mais utilizados são as lactonas macrocíclicas (Tabela 8), por serem muito seguras e eficazes em doses baixas (Ferasin & Knight, 2005). Estes fármacos actuam contra microfilárias (Ivermectina e Milbemicina), larvas de terceiro e quarto estadio, alguns adultos jovens, e podem diminuir a fertilidade das fêmeas. O tratamento mensal permite a eliminação completa de microfilárias em 6 a 12 meses, deve ser iniciado um mês antes da época de transmissão e continuado até dois meses depois de esta terminar.

**Tabela 8** – Quimioprofiláticos recomendados na prevenção da dirofilariose canina. (adaptado de Ferasin & Knight, 2005)

Substância activa	Dose recomendada	Frequência de administração
<b>Ivermectina</b>	6-12 µg/kg PO	mensal
<b>Milbemicina</b>	0,5-1,0 mg/kg PO	mensal
<b>Moxidectina</b>	3-6 µg/kg PO/SC	mensal (semestral, se injeção SC)
<b>Selamectina</b>	6-12 mg/kg PO/Tópico ( <i>spot on</i> )	mensal

Quando a quimioprofilaxia é iniciada ainda no período pré-patente, podem existir adultos depois de alguns meses, apesar de não permanecerem microfilárias, daí a importância de pesquisar antígenos para testar a eficácia da prevenção. No caso do tratamento profilático com lactonas macrocíclicas sofrer pequenas interrupções de 2 a 2,5 meses, o efeito residual dos fármacos provavelmente compensará essa falha. Contudo, interrupções superiores a 10 semanas devem ser monitorizadas e recomenda-se a pesquisa de antígenos 7 meses mais tarde (Meireles, n.d.). Doses diárias de Dietilcarbamazina (*per os*) eram usadas no tratamento profilático da dirofilariose, mas o aparecimento das lactonas macrocíclicas veio limitar a sua utilização. A acção residual da Dietilcarbamazina é mínima, pelo que pequenas interrupções da terapêutica, de 2 ou 3 dias por exemplo, podem comprometer a eficácia de protecção do fármaco. As lactonas macrocíclicas são, por isso, mais fiáveis, práticas e seguras (Ferasin & Knight, 2005).

### 1.3. Doenças causadas por protozoários

#### 1.3.1. Babesiose canina

##### 1.3.1.1. Etiologia e Epidemiologia

A babesiose canina é provocada por protozoários intraeritrocitários do género *Babesia*, que pertence à família Babesiidae (ordem Piroplasmida) e a sua transmissão faz-se através de ixodídeos. Este piroplasma tem distribuição mundial e está implicado na infecção de numerosas espécies de animais domésticos (cão e gato) e silvestres (lobos, raposas, chacais e cães selvagens, leopardos e leões, mustelídeos, entre outros) (Penzhorn, 2006), tendo vindo a ganhar interesse como zoonose emergente nos humanos (Irwin, 2005).

As técnicas recentes de análise filogenética molecular têm sido muito úteis na diferenciação entre as diferentes espécies de *Babesia* spp., mas também têm ajudado a elucidar a associação deste género com outros geneticamente próximos, como *Theileria* spp. e *Cytauxzoon* spp.. A espécie maior identificada nos cães é *Babesia canis*, da qual surgem 3 subespécies: *B. canis canis* (centro e sul da Europa), *B. canis vogeli* (Ásia, Austrália, Europa, África e Américas do Sul e do Norte) e *B. canis rossi* (sul de África), que se pensa serem transmitidas por espécies distintas de ixodídeos (Irwin, 2005, Figueiredo, 2007, Irwin, 2009). Os parasitas intracelulares variam em número e forma, podendo aparecer um organismo singular ou pares de piroplasmas, geralmente com forma piriforme ou pleomórfica (2x5 µm). Outra espécie de menores dimensões (0,8-1,2x3,2 µm), *Babesia gibsoni*, foi originalmente encontrado em cães na Índia e tem-se espalhado pela Ásia, Médio Oriente, algumas regiões de África, América do Norte, Europa e Austrália. No entanto, exceptuando os países asiáticos, os casos são esporádicos e surgem, provavelmente, associados à mobilidade de cães domésticos que acompanham os seus donos em viagens. Outros piroplasmas têm sido encontrados em canídeos, com características semelhantes às espécies referidas, mas que ainda estão por identificar (Irwin, 2005).

A babesiose canina é essencialmente uma doença tropical ou subtropical, mas ultimamente tem sido associada também a regiões temperadas. Nas zonas endémicas, a prevalência de anticorpos contra *Babesia* spp. pode variar entre 4% e 80%. Nos cães, os machos parecem ter maior susceptibilidade para adquirir a doença, assim como os animais jovens (Irwin, 2005, Figueiredo, 2007).

As espécies de ixodídeos implicadas na transmissão da babesiose canina incluem *Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor reticulatus* e *Haemaphysalis elliptica* (anteriormente conhecida como *H. leachi*) (Urquhart, Armour, Duncan, Dunn & Jennings, 1996, Bowman, 1999, Mehlhorn, 2001, Irwin, 2005, Figueiredo, 2007, Irwin, 2009). O primeiro parece ser o principal vector de *B. canis vogeli*, enquanto *Dermacentor* spp. está mais implicado na transmissão de *B. canis canis* e *Haemaphysalis elliptica* na de *B. canis rossi* (Mehlhorn, 2001, Irwin, 2009). Quando a carraça se alimenta num hospedeiro vertebrado, injecta

esporozoítos infectantes, juntamente com a saliva. Os parasitas multiplicam-se por divisão binária e provocam a ruptura dos eritrócitos infectados, libertando assim merozoítos que se disseminam e invadem outros eritrócitos (esquizogonia). Nas infecções crónicas, supõe-se que os piroplasmas ficam sequestrados nas redes de capilares do baço, fígado e outros órgãos, de onde são libertados periodicamente para a circulação sanguínea. Os vectores infectam-se quando se alimentam do sangue dum hospedeiro vertebrado infectado, numa fase de parasitemia. Já no vector, ocorre gametogonia (no intestino) e esporogonia, originando novos esporozoítos nas glândulas salivares. Durante a fase de esporogonia, há formação de organismos nos ovários da carraça, garantindo a transmissão transovárica dos parasitas nestes vectores (Mehlhorn, 2001, Irwin, 2005). A transmissão transtadial também parece ocorrer (Urquhart et al., 1996, Figueiredo, 2007). Apesar dos vectores serem a fonte de infecção mais comum, a transmissão da doença também pode ocorrer através da transfusão de sangue contaminado, via transplacentária, ou por transmissão horizontal (mordeduras de cães) (Irwin, 2005, 2009).

Na Europa, a doença é prevalente predominantemente na região do Mediterrâneo (Rochette, 2003, Figueiredo, 2007), identificando-se *B. canis canis* e *B. canis vogeli* como agentes etiológicos, sendo o primeiro mais frequente (Figueiredo, 2007). Nos países do norte da Europa, como a Alemanha, Grã-Bretanha, Bélgica e Holanda, tem aumentado o número de casos de babesiose, devido a importações de animais de países como França, Marrocos, Tunísia, Itália, Grécia, Hungria e a antiga Jugoslávia. Aliás, tanto na Holanda com na Alemanha já surgiram casos de babesiose autóctone (Rochette, 2003). Em Portugal, no nordeste Transmontano, já foi detectada a presença de babesiose em cães, maioritariamente com aptidão de caça, e suspeita-se que o ixodídeo *D. reticulatus* possa ser um vector importante da doença naquela região (Lopes & Rodrigues, 2007).

Os animais silvestres são também potenciais hospedeiros de *B. canis* e *B. gibsoni*, como revelou um estudo em que vários carnívoros, do género *Canis* e raposas (*V. vulpes*), demonstraram infecção por piroplasmas tipicamente parasitários de canídeos domésticos (Penzhorn, 2006). A presença concomitante de *B. canis* e *B. gibsoni* num lobo ibérico (*C. lupus signatus*) já foi detectada no PNPG, em Portugal, na sequência do aparecimento de um quadro clínico típico de babesiose nesse animal (Santos, Madeira de Carvalho, Pacheco & Fazendeiro, 2006).

A babesiose é uma zoonose emergente em algumas partes do mundo, contudo, com poucas excepções, as espécies de *Babesia* spp. que infectam os animais de companhia não têm sido implicadas na transmissão ao Homem. A maioria dos casos de babesiose em humanos surge associada a *B. microti*, um parasita natural de roedores na América do Norte, ou raramente, a *B. divergens*, um parasita dos bovinos, na Europa. Na Califórnia (EUA), estudos efectuados em humanos revelaram casos de infecções por piroplasmas com características muito próximas de *B. gibsoni* (Irwin, 2005).

### 1.3.1.2. Patogenia e Sintomas

A gravidade da doença nos cães varia muito consoante a espécie ou subespécie do parasita, a fase da doença, a idade e o estado imunitário do hospedeiro, bem como a presença de doenças concomitantes (Irwin, 2005, 2009, Figueiredo, 2007). A anemia hemolítica é o sintoma mais frequente, contudo, o grau de parasitemia nem sempre se correlaciona com a gravidade da anemia, sugerindo que diversos factores estão implicados na destruição dos eritrócitos.

Cada subespécie de *B. canis* apresenta uma patogenia própria, após um período de incubação de 10 a 21 dias. *B. canis rossi* é a mais patogénica e resulta normalmente numa síndrome hemolítica ou na resposta inflamatória aguda desproporcionada, enquanto *B. canis vogeli* é a menos patogénica das 3 subespécies. *B. canis canis* provoca parasitemia transitória e apresenta sinais de congestão dos órgãos (Irwin, 2009, Figueiredo, 2007).

A forma hiperaguda da doença é caracterizada pelo aparecimento rápido de sinais de anemia hemolítica intravascular, choque hipotensivo, hipóxia (Figueiredo, 2007), hemoglobinúria, alterações neurológicas e síndrome de insuficiência respiratória aguda (Irwin, 2005).

Na forma aguda, a sintomatologia resulta do grau de anemia e das lesões provocadas nos órgãos, surgindo febre, anemia, mucosas pálidas, icterícia e hemoglobinúria (Figueiredo, 2007). Esta forma da doença é a mais comum, verificando-se a recorrência dos sinais em cães infectados com estirpes mais virulentas. Cães com anemia aguda podem apresentar também anorexia, depressão, vómitos, letargia e petéquias (Rochette, 2003, Irwin, 2005). Na babesiose crónica, os sinais são geralmente menos específicos, observando-se anorexia, perda de peso e linfadenopatia (Irwin, 2005), esplenomegália e icterícia (Figueiredo, 2007).

O largo espectro de sinais associados à babesiose levou à classificação da doença em duas formas, uma complicada e outra não complicada (Irwin, 2005, Figueiredo, 2007). A última é normalmente relacionada com anemia leve a moderada, letargia, fraqueza, hepatomegália e esplenomegália, provocadas tipicamente pela infecção com *B. canis vogeli*. A babesiose complicada surge associada a sintomatologia que não pode ser explicada como consequência da crise hemolítica apenas. No sul de África, esta forma da doença tem sido atribuída a infecções por *B. canis rossi*, mas também tem um paralelo com a malária em humanos por *Plasmodium falciparum*, pois este ocasiona um quadro clínico similar, caracterizado por anemia grave e insuficiência de um ou mais órgãos (Irwin, 2005). Várias complicações podem surgir num quadro agudo da doença, como anemia hemolítica imunomediada, babesiose cerebral, que provoca alterações neurológicas graves (convulsões, estupor, coma), hipotensão e inflamação sistémica, coagulopatias que originam diátese hemorrágica, coagulação intravascular disseminada (CID) e trombocitopenia, insuficiência renal com nefrose hemoglobinúrica, insuficiência hepática (icterícia), síndrome



de insuficiência respiratória aguda, hemoconcentração e choque (Irwin, 2005, Figueiredo, 2007). A mortalidade na babesiose complicada pode exceder os 80% (Irwin, 2005).

É provável que a maioria dos cães que sobrevivem a uma infecção inicial se tornem portadores da doença, independentemente da resolução da sintomatologia. Muitos cães mantêm infecção subclínica, com parasitemias intermitentes e ligeiras. Nestes animais, situações de maior *stress*, tratamentos imunossupressivos ou a ocorrência de doenças concomitantes podem induzir a activação da babesiose que estava latente (Irwin, 2005).

### 1.3.1.3. Diagnóstico

O diagnóstico definitivo de babesiose canina requer a visualização dos parasitas em esfregaços de sangue. Adicionalmente, devem ter-se em conta os sinais clínicos e a respectiva analítica, bem como a eventual exposição ao vector (Irwin, 2005, Figueiredo, 2007).

A identificação da espécie de *Babesia* spp. pode ser valiosa para a escolha do tratamento mais adequado. A observação de esfregaços sanguíneos, corados pelos métodos de Romanowski (Giemsa ou *Diff-Quick*), ao microscópio óptico é o meio de diagnóstico directo mais usado, quer pela simplicidade de execução quer pelo baixo custo. No entanto, pode tornar-se morosa e tediosa, para além de que, nos casos de baixa parasitemia, a sensibilidade da técnica é reduzida (Irwin, 2005, Figueiredo, 2007).

Tanto a sorologia como os métodos moleculares constituem alternativas com boa eficácia no diagnóstico de babesiose. A amplificação de ADN de *Babesia* spp. pela técnica de PCR é altamente sensível e específica (Irwin, 2009), e é cada vez mais utilizada, sendo útil na detecção de infecções subclínicas, no rastreio de amostras de sangue de potenciais dadores (Irwin, 2005) e em estudos epidemiológicos (Irwin, 2009). Um estudo realizado com amostras de sangue de cães, provenientes de Espanha, revelou que 5 em 10 cães sintomáticos testaram positivo para a presença de *B. canis canis* (n=3), *B. canis vogeli* (n=1) e *B. equi* (n=1), enquanto 3 de 12 cães assintomáticos estavam infectados com *B. equi*, pela técnica de PCR (Criado-Fornelio, Martinez-Marcos, Buling-Saraña & Barba-Carretero, 2003). Criado-Fornelio et al. (2003) acrescentam ainda que o uso de técnicas mais sensíveis, como a que foi usada, permitem identificar novos hospedeiros para alguns piroplasmas, como ficou evidente através da infecção de cães com uma espécie tipicamente parasitária de equinos. Outro estudo, em Grenada (Caraíbas), demonstrou uma prevalência de 7% dos cães infectados com *B. canis vogeli*, por PCR (Yabsley et al., 2007). O PCR em tempo real veio acrescentar a vantagem da quantificação da carga parasitária, assim como a possibilidade de monitorizar a eficácia da terapêutica (Irwin, 2005, 2009). Recentemente, a técnica de PCR foi adaptada a papéis de filtro, com aplicação a trabalhos de campo, facilitando o transporte das amostras até ao laboratório (Irwin, 2009). Uma técnica de citometria de fluxo permite verificar a viabilidade das células parasitadas e obter informações

sobre o desenvolvimento da doença nas fases aguda e crónica, demonstrando ser mais sensível que a microscopia, apesar de necessitar de meios laboratoriais apropriados (Figueiredo, 2007).

No que respeita os métodos sorológicos, a IFI parece ser o teste mais fiável para complementar o diagnóstico clínico, estando disponíveis vários testes comerciais na Europa. A sorologia possui as vantagens de identificar portadores assintomáticos e de diagnosticar infecções crónicas, nos quais os níveis de parasitemia são baixos (Figueiredo, 2007). A IFI é bastante sensível, mas não evita a ocorrência de reacções cruzadas entre espécies de *Babesia* spp. (Irwin, 2005, 2009, Figueiredo, 2007) ou entre parasitas como *Neospora* spp. e *Toxoplasma* spp., originando falsos positivos (Irwin, 2005). O teste ELISA também apresenta boa sensibilidade e é moderadamente específico, mas ainda carece de padronização (Figueiredo, 2007).

As infecções concomitantes com outros hemoparasitas (*Ehrlichia* spp., *Mycoplasma* spp., *Hepatozoon* spp.), ou com outras formas de *Babesia* spp. são bastante comuns nas regiões endémicas e complicam, muitas vezes, o diagnóstico e o tratamento. Nestes casos, técnicas altamente sensíveis como o PCR podem ser uma mais valia para o diagnóstico (Irwin, 2005).

A melhor abordagem no diagnóstico de babesiose canina deverá consistir na aplicação de mais do que uma das técnicas referidas, já que todas elas apresentam limitações (Irwin, 2009, Figueiredo, 2007).

#### 1.3.1.4. Tratamento

Quando se procede ao tratamento da babesiose canina, devem ser tidos em conta vários factores, designadamente o estado clínico do animal, o grau de anemia, a identificação do parasita e o nível de parasitemia, assim como o potencial de toxicidade de alguns fármacos. Geralmente, é necessária a hospitalização do animal, excepto nos casos não complicados e ligeiros, para proceder ao tratamento antibabesial complementado por uma terapêutica de suporte, que permita também reverter a anemia. Na maioria dos casos, a eliminação completa dos parasitas não é conseguida, sendo apenas possível reduzir ao mínimo a parasitemia e induzir um estado subclínico (premunidade), com recuperação clínica (Irwin, 2005).

Os esquemas terapêuticos variam de acordo com a disponibilidade das substâncias activas., O dipropionato de imidocarb (5-6 mg/kg SC/IM, 2 doses num intervalo de 2 semanas) (Rochette, 2003, Irwin, 2005, Figueiredo, 2007) é o mais usado e interfere directamente no protozoário, actuando rapidamente com eficácia e com um efeito residual até 8 semanas (Irwin, 2009). Apesar de ser usado com segurança em cães muito jovens, este fármaco tem efeitos secundários que incluem dor no local de injeção, vómitos, diarreia, sialorreia e tremores musculares (Irwin, 2005), pelo que a administração prévia de atropina é

recomendada (Figueiredo, 2007). Pode ser administrado conjuntamente com tetraciclinas. A diminazina (3,5 mg/kg IM, dose única ou repetida 24 h depois) é administrada nos casos de infecção por *B. gibsoni*, apesar de poder provocar efeitos adversos neurológicos bastantes graves, pelo que o seu uso é limitado. Pode ainda ser combinada com o imidocarb nas infecções por *B. canis rossi*, com sucesso terapêutico (Irwin, 2005). Outras formulações pode ser utilizadas como alternativa, como a associação de atovaquona (13,3 mg/kg TID, PO, 10 dias) com azitromicina (10 mg/kg SID, PO, 10 dias) para combater *B. gibsoni* (Irwin, 2005), o isetonato de fenamidina (15 mg/kg, SC, dose única ou repetida 24 h depois) e o azul de tripano (10 mg/kg solução 1%, IV) (Irwin, 2005, Figueiredo, 2007).

Em complemento ao tratamento antiparasitário, a terapêutica de suporte é fundamental nos casos de babesiose complicada, em que a reversão da anemia é um dos principais objectivos a atingir para que a recuperação clínica do animal seja possível.

#### **1.3.1.5. Prevenção**

A prevenção da infecção por *Babesia* spp. depende, em grande escala, do controlo dos ixodídeos, algo raramente conseguido nas zonas endémicas da doença. Adicionalmente, existem vacinas que, embora não previnam a infecção, limitam a parasitemia e melhoram os sinais clínicos das infecções agudas. Estas vacinas produzidas a partir de antigénios atenuados provenientes de culturas de células, estão disponíveis na Europa e protegem contra *B. canis canis*, mas não têm protecção cruzada com outros piroplasmas (*B. canis rossi* e *B. gibsoni*, por exemplo) (Irwin, 2005, 2009). Fora da Europa são produzidas vacinas com protecção heteróloga para *B. canis canis* e *B. canis rossi* (Irwin, 2005).

### **1.3.2. Leishmaniose canina**

#### **1.3.2.1. Etiologia e Epidemiologia**

As leishmanioses são um grupo de doenças parasitárias que afectam pessoas e animais domésticos e silvestres, em todo o mundo, causadas por protozoários intracelulares do género *Leishmania*, pertencente à família Trypanosomatidae. A infecção é transmitida por flebótomos dos géneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (Baneth, Day, Roura & Shaw, 2005, Office International des Épizooties [OIE], 2008). A leishmaniose canina (LCan) é bastante frequente em cães de determinadas áreas geográficas, particularmente nos países da bacia Mediterrânica e da América do Sul. Nas regiões endémicas de leishmaniose visceral, os cães são o principal hospedeiro e reservatório da doença, apesar de esta também ser encontrada em zonas não endémicas (Dujardin et al., 2008, Observatório Nacional das Leishmanioses [ONLeish], 2009, Otranto et al., 2009).

As leishmanioses viscerais são geralmente zoonóticas, mas algumas podem ser antroponóticas, nas quais a transmissão é feita de pessoa para pessoa, via insecto. Nos humanos, a leishmaniose pode ser classificada em 3 formas, de acordo com o quadro

clínico apresentado: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose visceral (LV), sendo a última a forma mais severa da doença (Baneth et al., 2005, OIE, 2008).

Diferentes espécies do género *Leishmania* foram identificadas em várias partes do mundo, das quais se destacam *L. infantum*, *L. donovani* e *L. tropica*. A espécie *L. infantum* é considerada como o agente etiológico da LCan em Portugal e na região do Mediterrâneo, enquanto *L. donovani* é a espécie que provoca LV nos humanos com maior frequência. *L. tropica* raramente afecta canídeos, embora haja alguns casos descritos na bibliografia, sendo um agente importante da LC no Homem, em regiões do Médio Oriente e África (Marques, 2008).

A leishmaniose ocorre em zonas tropicais, subtropicais e temperadas do globo, incluindo o sul da Europa, África Central e do Norte, Médio Oriente, China e nas Américas Central e do Sul. A distribuição da doença e as épocas de transmissão variam com as populações de flebótomos vectores, e estão dependentes do clima e dos hospedeiros (Baneth et al., 2005). Geralmente, e Portugal não é excepção, a época de maior actividade dos vectores ocorre entre Maio e Outubro, podendo estender-se conforme as condições climáticas. Em Portugal, a LCan é endémica e as fêmeas de flebótomos normalmente implicadas na sua transmissão pertencem às espécies *Phlebotomus perniciosus* e *P. ariasi* (ONLeish, 2009).

Diversos factores têm contribuído para a disseminação da doença para regiões não endémicas, nomeadamente, pessoas e animais provenientes de zonas endémicas que viajam para áreas não endémicas, aumentando a incidência de casos nestas regiões. Por outro lado, o longo e variável período de incubação da doença (pode durar anos) e a ocorrência de cães infectados assintomáticos, não facilitam as estimativas de cálculo da prevalência nas áreas geográficas. Alguns estudos apontam para prevalências elevadas de LCan, ultrapassando os 50% nalguns locais do Mediterrâneo (Baneth et al., 2005, Otranto et al., 2009), mas geralmente a prevalência da doença ronda os 8,5-25% nessa região (Tabela 9) (Dujardin et al., 2008).

**Tabela 9** – Situação da leishmaniose canina em países endémicos da Europa (adaptado de Dujardin et al., 2008)

País	Portugal	Espanha	França	Itália	Grécia	Chipre	Turquia
<b>Seroprevalência de leishmaniose canina</b>	20%*	8,5% <sup>§</sup>	4-20% <sup>‡</sup>	2-15%*	25%*	20%*	15,7% <sup>§</sup>

\*média da seroprevalência em zonas endémicas da doença

<sup>§</sup> média da seroprevalência

<sup>‡</sup> seroprevalência em zonas endémicas do sul de França

O Observatório Português das Leishmanioses (ONLeish) revelou que cerca de 2,5 milhões de cães estão infectados com *L. infantum*, com base em estudos de prevalência de Espanha, França, Itália e Portugal. A mesma associação apresentou dados, obtidos em estudos de seroprevalência realizados em Portugal, que indicam algumas regiões do país

como endémicas, designadamente Trás-os-Montes e Alto Douro, a sub-região da Cova da Beira, os concelhos da Lousã e de Évora, a região de Lisboa e Setúbal e o Algarve. Adicionalmente, em quase todo o território continental já foram detectados casos de leishmaniose canina, como ilustra a Figura 5 (ONLeish, 2009).

**Figura 5** – Mapa da prevalência de infecção por *L. infantum* em Portugal. (ONLeish, 2009)



O parasita completa o seu ciclo de vida em dois hospedeiros diferentes, um vertebrado, onde *L. infantum* se apresenta na forma amastigota, e um flebótomo, onde são encontradas formas promastigotas (flageladas) do protozoário. Quando uma fêmea de flebótomo infectada se alimenta, os promastigotas são injectados juntamente com a saliva na pele do hospedeiro vertebrado. Os flebótomos infectam-se pela ingestão de formas amastigotas, aquando da refeição num hospedeiro infectado. Já no intestino dos insectos, os amastigotas transformam-se em promastigotas, que posteriormente migram para o hipostoma e são, eventualmente, inoculados num novo hospedeiro, enquanto o flebótomo se alimenta (Baneth et al., 2005, Marques, 2008). O tempo que decorre para que o ciclo se complete no insecto é de cerca de 6 a 14 dias, embora varie consoante a espécie de *Leishmania* spp., do vector e das condições ambientais (Marques, 2008).

Apesar da transmissão de *L. infantum* ocorrer naturalmente pela picada de flebótomos, foi descrito um caso de transmissão vertical numa cadela aos seus cachorros. Também foi comprovada a transmissão do agente através de transfusões de sangue infectado em cães (Baneth et al., 2005, Marques, 2008). Ainda que tradicionalmente considerada uma doença de zonas rurais, a LCan tem sido observada cada vez mais em áreas urbanas e peri-

urbanas. O abandono de animais e a falta de controlo dos cães são factores importantes para a saúde pública, uma vez que podem ser reservatórios da doença (ONLeish, 2009). Um estudo (Criado-Fornelio et al., 2000) efectuado em raposas (*V. Vulpes*), em Espanha, revelou uma prevalência de 74,6%. Em Portugal, Semião-Santos et al (1996) demonstraram infecção por *L. infantum* em 4 de 5 raposas, na região da Arrábida, enquanto Abranches, Conceição-Silva & Silva-Pereira (1984) detectaram uma prevalência de 5,63% em raposas, na mesma zona. Pereira da Fonseca et al. (2002) registaram prevalências de 34-50% em raposas provenientes de várias regiões do país (desde a Beira Alta até ao Baixo Alentejo), sugerindo que aquela espécie silvestre pode ser um potencial reservatório da doença.

#### 1.3.2.2. Patogenia e Sintomas

A sintomatologia e a patogenia da leishmaniose estão intimamente relacionadas com a interacção entre o parasita, o vector e o sistema imunitário do hospedeiro. Nos animais susceptíveis, as formas promastigotas inoculadas pelo vector aderem rapidamente aos macrófagos na pele, usando receptores complemento. Segue-se a fagocitose dos promastigotas, que se transformam em formas amastigotas, nos fagolisosomas. Inicialmente, origina-se um infiltrado granulocítico que domina a resposta inflamatória cutânea local, seguindo-se uma resposta por parte de macrófagos e células *natural killer*, e mais tarde de linfócitos. A disseminação dos parasitas para os linfonodos locais, o baço e a medula óssea, em apenas algumas horas, torna-se bastante importante, particularmente na leishmaniose visceral. Contudo, nos animais resistentes, os protozoários permanecem localizados na pele ou não se disseminam para além dos linfonodos locais. Uma vez infectados, os hospedeiros susceptíveis podem permanecer assintomáticos durante meses ou anos, com um período de incubação que pode atingir os 7 anos (Baneth et al., 2005, ONLeish, 2009, Marques, 2008). Ratos, cães e humanos geralmente desenvolvem doença crónica e progressiva, se a resposta imunitária for de tipo 2 (Th2), ao contrário dos animais que reagem predominantemente com uma resposta imunitária de tipo 1 (Th1), que são assintomáticos ou demonstram apenas doença moderada e auto-limitante (Baneth et al., 2005). De facto, a susceptibilidade e resistência à infecção por *L. infantum* parece ter uma base genética, sugerindo que as raças de cães autóctones sejam mais resistentes do que as raças de cães exóticas e importadas (ONLeish, 2009). A resistência pode estar associada às interacções iniciais entre o agente patogénico e algumas moléculas expressas por células apresentadoras de antígenos do sistema imunitário. Estudos recentes sugerem o papel de populações reguladoras de linfócitos T com importância na patogenia da doença, ao inibirem a função das células Th1, prevenindo assim a eliminação completa dos parasitas e estabelecendo uma infecção persistente. Os animais susceptíveis montam uma resposta de anticorpos exagerada, mas apresentam uma imunidade celular fraca, em contraste com os cães resistentes, que têm respostas humorais reduzidas, mas uma forte imunidade

celular com produção de citocinas relacionada com a acção de células Th1 (Baneth et al., 2005).

Estas interacções imunológicas ajudam a explicar os efeitos clínico-patológicos evidentes na LCan. Cães que desenvolvem uma infecção disseminada apresentam sinais clínicos e lesões durante um período de 3 meses até vários anos após a infecção. Os macrófagos parasitados tendem a acumular-se em diversas zonas do organismo do hospedeiro, particularmente nos órgãos linfóides, originando linfadenites granulomatosas generalizadas, esplenomegália e hepatomegália. A extensão da doença leva, normalmente, ao desenvolvimento de dermatite granulomatosa, uveíte e infiltração da medula óssea pelos macrófagos infectados. Outras lesões granulomatosas podem ser encontradas nas meninges, pericárdio, intestino e músculos. Nos cães susceptíveis, que desenvolvem uma resposta do tipo 2, ocorre a activação policlonal não específica e excessiva de linfócitos B, acompanhada de hiperplasia folicular linfóide e hipergamaglobulinémia. Consequentemente, surgem lesões nos tecidos provocadas pela activação de mecanismos de hipersensibilidade de tipo II e III. Pode ocorrer anemia hemolítica imuno-mediada (positiva no teste de Coombs) e trombocitopenia, assim como reacções positivas para anticorpos antinucleares (ANA), que permitem diferenciar a leishmaniose de doenças como o lúpus eritematoso sistémico. A circulação de complexos imunes é frequente e pode originar glomerulonefrite, uveíte e sinovite por acumulação desses complexos (Baneth et al., 2005, ONLeish, 2009).

A LCan tem uma evolução crónica víscero-cutânea (OIE, 2008), começando geralmente por uma história de apatia progressiva e intolerância insidiosa ao exercício físico (ONLeish, 2009), com linfadenomegália, sinais cutâneos, perda de peso, esplenomegália e palidez das membranas mucosas (Rochette, 2003, Baneth et al., 2005). Os sinais cutâneos têm grande importância e são provavelmente os mais evidentes, incluindo a dermatite exfoliativa com alopecia e produção de crostas acinzentadas na face, região periocular e nos pavilhões auriculares. Estas lesões têm uma prevalência que varia entre os 56% e os 90% (Baneth et al., 2005, Marques, 2008), e tendem a espalhar-se para o resto do corpo do animal, podendo mesmo surgir dermatite ulcerativa e nodular. Observa-se também o crescimento exagerado das unhas e corrimento nasal sanguinolento (epistáxis) (Baneth et al., 2005, ONLeish, 2009). A perda de peso e a atrofia muscular são muito frequentes quando existe um comprometimento visceral (ONLeish, 2009). Há ainda registo de casos com sintomatologia não sistémica, nomeadamente, colite, miosite, osteomielite, artrosinovite e doença ocular isolada (Rochette, 2003, Baneth et al., 2005, Marques, 2008, ONLeish, 2009). A clínica analítica apresenta predominantemente níveis elevados de globulinas, devido à produção excessiva de gamaglobulinas, e também hipoalbuminemia, justificada pela perda de proteínas associada à glomerulonefropatia. Outros resultados comuns incluem anemia, com reacções positivas no teste de Coombs e para a presença de ANA, trombocitopenia e,

por vezes, alterações hemostáticas com tempos de coagulação aumentados (Baneth et al., 2005, Marques, 2008).

Nos cães, as glomerulonefrites originam frequentemente insuficiência renal crónica, agravando consideravelmente o estado geral dos animais e, constituindo assim a principal causa de morte por LCan. Adicionalmente, a imunossupressão, causada pela própria doença, pode promover a ocorrência de infecções concomitantes, como as sarnas demodécica e sarcóptica, hepatozoonose, ehrlichiose e anaplasmose (Baneth et al., 2005), dermatite, gastroenterite e pneumonia (Baneth et al., 2005, ONLeish, 2009).

### 1.3.2.3. Diagnóstico

A confirmação do diagnóstico de leishmaniose pode ser difícil, principalmente na presença de sinais clínicos inespecíficos. Por outro lado, a eficácia dos testes de diagnóstico varia muito com a fase da doença e a carga parasitária (Baneth et al., 2005, Marques, 2008). Por isso, uma abordagem que envolva a aplicação de mais do que um teste é recomendável (Baneth et al., 2005).

O diagnóstico de leishmaniose pode ser realizado pela observação microscópica directa de *L. infantum* e por cultura ou inoculação em animais de laboratório, mas também através de técnicas sorológicas e métodos moleculares (Baneth et al., 2005, Marques, 2008).

A demonstração do protozoário é o único meio de confirmar o diagnóstico da doença. Na LCan e na LV, o isolamento e identificação do parasita podem ser efectuados a partir de biópsias de linfonodos, medula óssea, conjuntiva, baço e fígado, enquanto que na LC podem ser colhidas raspagens ou aspirados de lesões cutâneas (Baneth et al., 2005, Marques, 2008). Estas amostras são colocadas em lâminas e coradas pelo método de Giemsa, antes de se proceder à visualização microscópica. O método de eleição para encontrar as formas parasitárias nos canídeos, corresponde à biópsia por aspiração de tecido dos linfonodos ou medula óssea. Contudo, alguns autores sugerem o uso de punção aspirativa do baço, pois podem ocorrer resultados falso-negativos em cães assintomáticos que tenham um número reduzido de amastigotas nos linfonodos e na medula óssea (Marques, 2008). Todavia, não é efectuada por norma devido aos perigos associados à sua execução.

Nas amostras de hospedeiros vertebrados, as formas amastigotas apresentam um corpo redondo ou oval (1,5-3x2,5-6,5 µm), com um núcleo relativamente grande e um cinetoplasto em forma de bastonete, e encontram-se dentro de vacúolos no citoplasma de macrófagos, ou extracelularmente (Baneth et al., 2005, OIE, 2008). Os promastigotas, retirados de vectores, são organismos extracelulares alongados (15-20x1,5-3,5 µm), com um único flagelo (OIE, 2008). No entanto, a sensibilidade do exame microscópico é relativamente reduzida, cerca de 60%, uma vez que mais de 50% das amostras de linfonodos e medula óssea têm baixa carga parasitária (Baneth et al., 2005).



Em relação à cultura e ao isolamento em animais de laboratório, são limitados pela baixa sensibilidade que apresentam (Marques, 2008). A cultura mostra algumas vantagens em relação ao isolamento *in vivo*, por obter resultados mais rápidos (5 a 30 dias vs. meses para que apareçam lesões nos animais) e ser menos dispendiosa. Não existe um meio de cultura ideal, existindo vários meios adequados ao crescimento do parasita, nomeadamente, o NNN (Novy, McNeil and Nicolle), o BHI (*brain-heart infusion*), o EMTM (*Evan's modified Tobie's médium*) ou o agar-sangue semisólido de Locke, entre outros (Marques, 2008, OIE, 2008). Os protozoários tendem a crescer a uma temperatura óptima de 22° a 25°C (Marques, 2008). O hamster é o animal mais usado na inoculação de *Leishmania* spp., via intraperitoneal. O parasita multiplica-se e podem ser observadas as formas amastigotas nos macrófagos peritoneais ao fim de 3 a 4 semanas, bem como algumas lesões cutâneas ou viscerais, depois de semanas a meses (Marques, 2008, OIE, 2008).

A maioria dos cães com LV desenvolve uma resposta humoral específica, pelo que a sorologia é amplamente utilizada no diagnóstico da doença. A sensibilidade das técnicas sorológicas é menor (41%) nos primeiros meses de infecção (1,5 a 3 meses), mas aumenta progressivamente com a evolução da doença, atingindo valores entre 93% e 100% (Marques, 2008). A ocorrência de reactividade cruzada pode dar origem a falsos-positivos em cães com leishmaniose cutânea, doença de Chagas, ehrliquiose, riquetsiose, toxoplasmose ou com parasitas *Trypanossoma* spp. (principalmente nas Américas do Sul e Central) (Baneth et al., 2005, Marques, 2008). Dentro dos testes sorológicos, os mais utilizados são a IFI, ELISA, aglutinação directa (AD) e ICR. Outras técnicas usadas incluem a fixação do complemento, HAI, IB e imuno-electroforese (Marques, 2008).

A IFI constitui o método de eleição da sorologia para a detecção de anticorpos, geralmente IgG, apresentando elevada especificidade (100%) e sensibilidade (98,4-99,5%). É de fácil execução e permite distinguir entre géneros (OIE, 2008). Existem no mercado lâminas com formas promastigotas de *L. infantum* zimodeme MON-1, estirpe mais frequente na bacia Mediterrânica (Marques, 2008).

No que respeita a técnica de ELISA, destaca-se pela facilidade de emprego em amostras de soro ou sangue, sendo muito usada em estudos epidemiológicos. Existem poucas ou nenhuma reacções cruzadas com outras doenças, consoante as estirpes de *Leishmania* spp. aplicadas, variando a sensibilidade entre os 86% e os 99%. Uma outra versão, designada FAST-ELISA (*Falcon assay screening test* ELISA), é bastante sensível, específica e tem uma boa adaptação aos casos de leishmaniose visceral canina, tendo ainda a vantagem de obter resultados sem a necessidade de um microscópio ou espectrofotómetro (OIE, 2008). Estes métodos de ELISA usam preparações de antígenos crus, mas recentemente surgiu uma técnica que utiliza antígenos recombinantes duma proteína de *L. infantum*, a rK39 (Baneth et al., 2005, Marques, 2008, OIE, 2008). Esta aplicação em casos de leishmaniose visceral canina e humana provou ter 99% de

sensibilidade e especificidade, reduzindo a também a ocorrência de reacções cruzadas (OIE, 2008).

A AD é uma técnica sensível e específica, que não requer equipamento especial nem é dispendiosa (Marques, 2008). Uma modificação deste teste para a detecção de anticorpos em canídeos provou ser adequada para o diagnóstico de LCan e para estudos epidemiológicos e ecológicos em larga escala, demonstrando 100% de sensibilidade e 98,9% de especificidade (OIE, 2008).

A ICR é um método extremamente rápido e simples, que usa a proteína rK39 como antígeno para detectar infecção por *L. infantum*, quer em cães sintomáticos quer em cães assintomáticos. A sua sensibilidade é de 97% e a especificidade chega aos 100% nos canídeos, enquanto que em casos de LV humana no Mediterrâneo, tanto a sensibilidade como a especificidade atingem os 100% (OIE, 2008).

A técnica de IB tem sido usada com altas sensibilidade e especificidade, apesar de ser mais complexa e morosa, constitui uma boa alternativa na resolução de casos duvidosos e para identificar animais assintomáticos com baixos títulos sorológicos (Marques, 2008).

Os métodos moleculares baseados no PCR estão disponíveis para diagnóstico e identificação do parasita em diferentes tipos de amostras de canídeos e humanos. A sua aplicação em medula óssea, linfonodos e biópsias de pele revelou sensibilidades de cerca de 95-100%. Contudo, a sensibilidade do PCR em amostras de sangue periférico tende a decrescer com a progressão da doença (Baneth et al., 2005). Para melhorar a sensibilidade do teste, o *nested*-PCR ou *semi-nested*-PCR podem ser usados. Outras técnicas de PCR são mais sensíveis e específicas, como o PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), ou o PCR em tempo real, que tem as vantagens de ser quantitativo e ajudar na monitorização da resposta à terapêutica, e de ter bons resultados em amostras de sangue (OIE, 2008).

#### 1.3.2.4. Tratamento

No tratamento da LCan podem ser administrados vários fármacos com melhorias clínicas evidentes, mas raramente associadas à eliminação total do parasita ou à prevenção de recidivas. A terapêutica de suporte é especialmente importante em cães que apresentem insuficiência renal ou hepática.

Os antimoniais pentavalentes são amplamente usados contra diferentes formas de leishmaniose em animais e pessoas. Inibem selectivamente os enzimas de *Leishmania* spp. necessários na oxidação glicolítica e dos ácidos gordos (Baneth et al., 2005). O antimoniató de meglumina (100 mg/kg, SID/BID, IV/SC, 3-4 semanas) é o principal antimonial aplicado na terapêutica singular em cães, ou em combinação com outros fármacos, embora haja algumas resistências a esta substância. Os análogos das purinas, como é o caso do alopurinol (20 mg/kg, SID, PO), são administrados oralmente e metabolizados pelos

parasitas. Inclui numerosas vantagens, como toxicidade reduzida, eficácia clínica, baixo custo e via de administração conveniente, que fazem deste fármaco uma escolha frequente para o tratamento da LCan. Geralmente é combinado com o antimoníaco de meglumina, permitindo a redução do tempo de administração deste, que é assim melhor tolerado e menos dispendioso. Adicionalmente, o tratamento prolongado com alopurinol diminui a probabilidade de recidivas após a terapêutica com antimoníaco de meglumina. A anfotericina B é um macrólido polieno que, apesar de ser mais usado no tratamento de infecções fúngicas, tem também acção contra alguns protozoários. Pode ser administrada em cães livres de doença renal, já que é nefrotóxica, sob a forma de emulsão lipídica ou numa formulação liposomal, que reduz o efeito tóxico e melhora a sua eficácia. Outros fármacos com utilidade para o tratamento da LCan são, designadamente, pentamidina (também usada para tratar babesioses e tripanossomoses), aminosidina, miltefosina, metronidazol e cetoconazol (Handman, 2001, Baneth et al., 2005, Marques, 2008). Aconselha-se a repetição de análises após 3 meses de tratamento, para monitorizar a resposta ao mesmo (ONLeish, 2009). O prognóstico da doença é reservado e depende fundamentalmente da severidade das lesões, do tempo decorrido até ao estabelecimento do diagnóstico, da capacidade de resposta imunitária do hospedeiro e da progressão da doença. Animais que não sofram de insuficiência renal, geralmente têm bons resultados com o tratamento, melhorando a sintomatologia cutânea e visceral (Marques, 2008).

#### **1.3.2.5. Prevenção**

As medidas de prevenção e controlo das leishmanioses têm sido, em geral, infrutíferas. Alguns países, particularmente na América do Sul, praticam a eutanásia de cães seropositivos, um método inaceitável para os donos e pouco eficaz, uma vez que os animais assintomáticos (tanto domésticos como silvestres) permanecem como fonte de transmissão do agente. Em Portugal, caso os donos não optem pelo tratamento, são obrigados a eutanasiar o animal (Decreto-Lei nº314/2003 de 17 de Dezembro), uma vez que sem terapêutica a doença é mortal e eleva o risco de transmissão, em termos de saúde pública (ONLeish, 2009). Por outro lado, a terapêutica médica, quando aplicada, é dirigida apenas aos animais sintomáticos, na maioria das vezes, e nem sequer elimina totalmente o parasita (Baneth et al., 2005). Actualmente, não existe uma vacina eficaz e segura contra a LCan e humana, embora haja preparações vacinais em estudo. Uma vacina de 1ª geração obtida a partir de *L. donovani* e desenvolvida no Brasil, representa a primeira vacina veterinária licenciada contra a LCan, cujos estudos de campo demonstraram cerca de 80% de eficácia na protecção clínica e boa eficiência imunoterapêutica, quando usada em cães doentes. Outras vacinas de 2ª geração em pré-desenvolvimento consistem em parasitas modificados geneticamente incapazes de produzir doença, e moléculas ou organismos recombinantes que exprimem antigénios do parasita (OIE, 2008).

## 1.4. Doenças causadas por vírus

### 1.4.1. Flebovírus – Vírus Toscana

#### 1.4.1.1. Etiologia e Epidemiologia

O género *Phlebovirus* pertence à família *Bunyaviridae*. Os vírus desta família possuem envelope, são pleomórficos e têm cerca de 80 a 120 nm de diâmetro (Ardans & Maclachlan, 2004). Todos são constituídos por três segmentos de cadeia simples negativa de ARN, designadamente L (*large*), M (*medium*) e S (*small*). O segmento L codifica a polimerase viral. O segmento M codifica as glicoproteínas do envelope (G1 e G2), responsáveis pela neutralização e hemaglutinação, e provavelmente uma ou duas proteínas não estruturais. O segmento S codifica a proteína N da nucleocápside, principal antígeno identificado na resposta do sistema imunitário humano em infecções pelo vírus Toscana, e uma proteína não estrutural, a NSs (Amaro, Ciufolini, Venturi, Fiorentini & Alves, 2007). A replicação destes vírus ocorre no citoplasma das células do hospedeiro.

*Phlebovirus* spp. inclui agentes etiológicos da febre por flebótomos, que surge na bacia do Mediterrâneo, Médio Oriente, Paquistão e Índia. Existem mais de 60 vírus diferentes do género *Phlebovirus*, dos quais oito (Alenquer, Candiru, Chagres, Punta Toro, Rift Valley, Nápoles, Sicília e Toscana) podem ser patogénicos para humanos (Amaro et al., 2007). O serótipo Toscana, assim denominado por ter sido isolado pela primeira vez na região da Toscana, em 1971, é um dos principais agentes etiológicos de meningites, meningoencefalites ou encefalites em países endémicos. É transmitido pela picada de flebótomos, nomeadamente *Phlebotomus perniciosus* e *P. perfiliewi*. A presença de anticorpos contra o vírus Toscana (TOSV) já foi demonstrada em pacientes de vários países da Europa, entre eles, Itália (26,6% a 52% dos casos de patologia neurológica), Chipre (20% da população saudável) (Amaro et al., 2007), Espanha (9% a 26,2% dos pacientes com meningite asséptica) (Mendoza-Montero, Gámez-Rueda, Navarro-Marí, Rosa-Fraile & Oyonarte-Gómez, 1998), Portugal, sudeste de França, Alemanha (1-1,6%) e Grécia (60% nas ilhas e 35% no oeste continental) (Charrel et al., 2005, Amaro et al., 2007). Vários casos foram detectados em pessoas provenientes de países não endémicos que viajaram para regiões endémicas da doença (como aconteceu em França, Chipre e Portugal) (Mendoza-Montero et al., 1998, Charrel et al., 2005).

Em Portugal, foi confirmada a presença de 5 espécies de flebótomos, *P. papatasi*, *P. ariasi*, *P. sergenti*, *P. perniciosus* e *Sergentomyia minuta*, com maior actividade entre os meses de Maio e Outubro. *P. perniciosus*, um dos vectores do TOSV, está amplamente distribuído no nosso país. Contudo, a forma como os flebovírus se mantêm na natureza ainda não está completamente esclarecida. A transmissão parece ocorrer por via transovárica e venérea nos vectores, mas não se conhece(m) o(s) verdadeiro(s) reservatório(s) do vírus. O TOSV foi isolado do cérebro de um morcego (*Pipistrellus kuhlii*) em Itália, e também se detectou

seropositividade para flebovírus em ratos (*Neotoma micropus*) no Texas (EUA), e em gerbilos (*Rhombomys opimus*) no Irão. Adicionalmente, os flebótomos podem alimentar-se de mamíferos e de aves, o que torna os roedores e as aves hospedeiros reservatórios suspeitos na transmissão dos flebovírus (Amaro et al., 2007).

#### **1.4.1.2. Patogenia e Sintomas**

Em geral, as infecções por flebovírus em humanos caracterizam-se por um período de incubação de 2 a 6 dias (Kallio-Kokko, Uzcategui, Vapalahti & Vaheri, 2005), com febres altas (39-40°C) que persistem entre 6 e 74 horas (Amaro et al., 2007). Para além da febre, outros sintomas típicos de meningite asséptica podem surgir, tais como cefaleias, vômitos, fotofobia, rigidez na nuca e dores oculares. Sinais de encefalite aguda, como alterações na consciência e/ou convulsões também ocorrem (Braitto et al., 1998). A evolução clínica é geralmente benigna, observando-se uma resolução espontânea da doença em cerca de 7 a 10 dias, mesmo sem terapêutica medicamentosa. Num estudo de casos efectuado na Toscana (Braitto et al., 1998), pacientes infectados com o TOSV que voltaram à consulta de seguimento apresentaram cefaleias persistentes durante 15 a 20 dias após terem tido dispensa do hospital. As sequelas neurológicas são pouco frequentes, mas já foram descritos alguns casos de meningo-encefalite severa com sequelas neurológicas e envolvimento sistémico da doença. Em regiões endémicas, onde o risco da picada por flebótomos é elevado, ocorrem também infecções assintomáticas (Baldelli et al., 2004).

#### **1.4.1.3. Diagnóstico**

O diagnóstico directo pode ser realizado a partir de amostras de LCR colhidas nos primeiros dias de virémia. O isolamento do vírus é conseguido pela inoculação em culturas celulares de células Vero E6, BHK-21, CV1 e SW13, onde o vírus se replica e produz um efeito citopático. Contudo, a cultura de células parece ter baixa sensibilidade para a detecção do TOSV (Charrel et al., 2005). Outro modo de isolar o vírus consiste na inoculação intracranial de murganhos (Kallio-Kokko et al., 2005). Os testes sorológicos detectam anticorpos específicos (IgM, IgG ou ambas) e são amplamente usados, apesar de se verificarem reacções cruzadas entre vírus do género *Phlebovirus* e, especificamente, entre o TOSV e o serótipo Nápoles (Charrel et al., 2005). O teste ELISA torna-se vantajoso quando é necessário testar um grande número de amostras. Este pode ser executado a partir de antígeno extraído de cérebros de murganhos recém-nascidos, apesar de recentemente ter sido desenvolvido um ELISA baseado num gene recombinante da nucleoproteína (Charrel et al., 2005). A IFI é outra alternativa para detectar a presença de anticorpos específicos, e pode ser produzida com células Vero infectadas com o TOSV (Valassina, Cusi & Valensin, 2003). A inibição da hemaglutinação é menos sensível que a IFI e ELISA (Amaro et al., 2007). O teste de eleição para a confirmação do agente específico é o Teste de

Neutralização em Placas (PRNT), que permite distinguir entre os diferentes serótipos (Toscana, Nápoles e Sicília) (Charrel et al., 2005). O teste *Western blot* é pouco fiável na detecção de anticorpos anti-G1 e anti-G2, provavelmente pela limitação técnica que impede a manutenção da conformação dos epítomos envolvidos na resposta humoral (Valassina et al., 2003). Por vezes, o nível de vírus no LCR é tão baixo que impossibilita o isolamento do vírus, nestes casos, técnicas moleculares como o PCR são mais sensíveis que os restantes testes. A aplicação de RT-PCR como único teste (usando *primers* no segmento S) provou ser insuficiente para detectar o TOSV, no entanto, se a este teste se seguir um *nested-PCR* os resultados são bastante fiáveis (Charrel et al., 2005). Recentemente, ensaios de PCR em tempo real, com sondas marcadas com corantes fluorescentes, vieram reduzir o risco de contaminação. A sua sensibilidade é semelhante à do *nested-PCR*, mas os resultados são obtidos em apenas 3 horas (Charrel et al., 2005). Este tipo de técnicas moleculares facultou a identificação de diferentes variantes de TOSV (Valassina et al., 2003), que circulam em Itália e, provavelmente, na região do Mediterrâneo.

#### **1.4.1.4. Tratamento e Prevenção**

De um modo geral, o tratamento específico contra o TOSV não é preconizado, uma vez que a doença tem resolução espontânea e não existe uma substância efectiva contra o vírus, pelo que apenas poderá aplicar-se a terapêutica de suporte, quando necessário. A prevenção da infecção pelo TOSV é limitada ao controlo dos vectores, com insecticidas e repelentes (Kallio-Kokko et al., 2005).

#### **1.5. Controlo de vectores**

As infecções transmitidas por artrópodes são prevenidas, de um modo geral, através do controlo dos vectores. Contudo, a aplicação de substâncias químicas no ambiente pode tornar-se dispendiosa e resultar em efeitos não desejados noutros organismos, que não os alvos principais, assim como pode originar resistências aos próprios químicos. Pelas razões apontadas, a escolha dos produtos requer ponderação sobre a espécie de vector em questão, o seu comportamento e ciclo biológico, bem como os mecanismos de transmissão da infecção e o nível de infecciosidade (Wall & Pitts, 2005).

Ao longo do tempo, foram desenvolvidos diversos produtos de administração tópica ou sistémica para animais domésticos, que protegem contra a picada de vectores ou actuam como repelentes. Esta nova geração de insecticidas e acaricidas inclui substâncias como o fipronil, o imidaclopride e a selamectina, mas também reformulações de compostos que já existiam, nomeadamente, o amitraz e as piretrinas, como a permetrina. Muitos dos produtos são altamente específicos para os artrópodes, o que os torna mais seguros para os mamíferos, para além de terem efeito residual, o que permite reduzir a frequência de administração. Outros produtos combinam ectoparasiticidas com inibidores do

desenvolvimento dos vectores, como é o caso do metopreno. As formulações disponíveis são variadas, desde aplicações *spot-on*, a aerossóis, banhos, colares, champôs, espumas e pós, assim como preparações orais. Nos casos de tratamento ambiental de instalações domésticas, os tradicionais insecticidas (organofosforados, carbamatos, piretrinas) usados sozinhos ou combinados com reguladores do crescimento de insectos, e o controlo biológico com nemátodes são adequados. Ainda que as opções de prevenção das picadas por vectores sejam variadas, os animais devem ser inspeccionados regularmente pelos seus donos, para detectar e remover correctamente as carraças. Adicionalmente, deve evitar-se a exposição dos animais a áreas com elevado risco de ocorrência de vectores, principalmente nas épocas de maior densidade populacional dos artrópodes (Wall & Pitts, 2005).

Apesar das diversas medidas de controlo de vectores disponíveis para animais domésticos, o controlo dos artrópodes nos reservatórios selvagens ainda constitui um grande desafio.

## **2. Toxoplasmose**

### **2.1. Etiologia e Epidemiologia**

A toxoplasmose é uma doença zoonótica, com ampla distribuição mundial, que afecta uma vasta lista de vertebrados homeotérmicos, incluindo humanos (Meireles, Galisteo, Pompeu & Andrade Jr, 2004). O agente etiológico é o *Toxoplasma gondii*, um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, subclasse Coccidia. Este parasita intracelular obrigatório pode assumir várias estruturas morfológicas, nomeadamente oocistos (10 x 12 µm), formas proliferativas ou taquizoítos (2-4 x 4-8 µm, ovais ou em forma de crescente) e formas enquistadas com bradizoítos (Rochette, 2003).

Estão definidas 3 linhas clonais do parasita (tipos I, II e III), que diferem na virulência e no padrão epidemiológico de ocorrência (Montoya & Liesenfeld, 2004). Os tipos II e III estão associados com a doença em animais, enquanto o tipo I é predominantemente identificado em humanos (OIE, 2008). Pessoas com doença congénita têm apresentado também o tipo I de *T. gondii*. A evolução natural da virulência deste protozoário tem resultado da recombinação sexual entre duas linhas clonais diferentes e competitivas (Montoya & Liesenfeld, 2004).

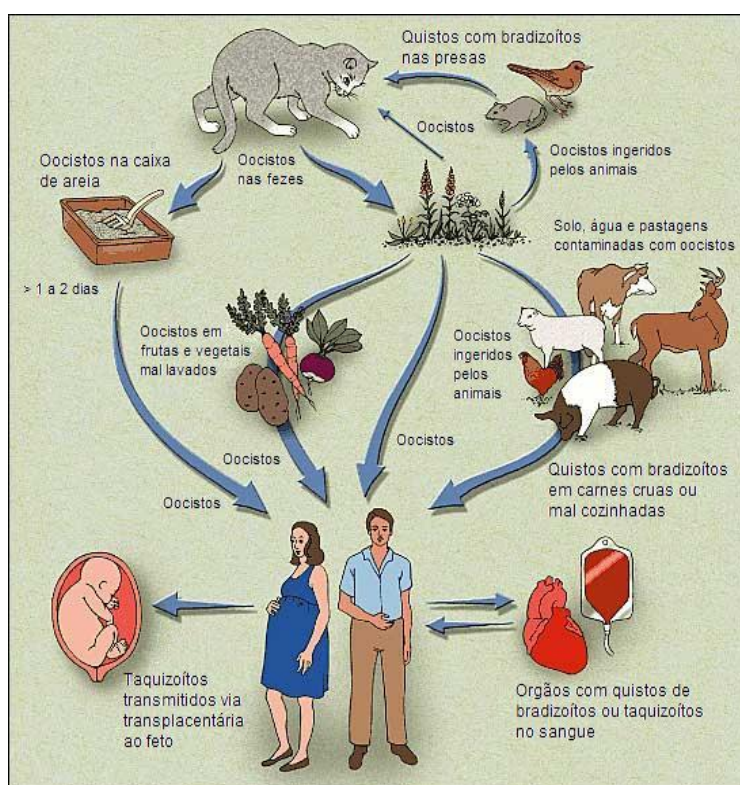
Os gatos e outros felídeos são os hospedeiros definitivos de *T. gondii*, onde a replicação do parasita ocorre a nível do intestino do gato (ciclo sexual entérico), com a produção de oocistos (Figura 6). Durante uma infecção aguda, os oocistos são eliminados nas fezes do gato por um período de 7 a 21 dias (Meireles et al., 2004, Montoya & Liesenfeld, 2004). Já no exterior, os oocistos esporulam nos primeiros 5 dias, dependendo das condições de oxigenação, humidade e temperatura. Estes oocistos são bastante resistentes às condições ambientais e podem permanecer infectantes durante um ano ou mais (Pan American Health Organization [PAHO], 2001, Meireles et al., 2004, OIE, 2008). Adicionalmente, podem ser

disseminados pela acção mecânica de invertebrados no solo, como moscas, insectos rastejantes, anelídeos e outros animais (Hill & Dubey, 2002).

Os oocistos esporulados constituem a forma infectante para os animais e, ao serem ingeridos por estes, originam taquizoítos. Os taquizoítos são formas de rápida multiplicação de *T. gondii*, que penetram activamente nas células nucleadas do hospedeiro intermediário, formando vacúolos citoplasmáticos. Após repetidas replicações, as células hospedeiras sofrem ruptura e dá-se a disseminação dos taquizoítos pela corrente sanguínea e outros tecidos, incluindo o SNC, olhos, músculos esquelético e cardíaco, esqueleto e placenta. A presença dos taquizoítos desencadeia uma forte resposta inflamatória e a destruição de mais tecidos. Sob a pressão da resposta imunitária, os taquizoítos transformam-se em

estruturas de multiplicação lenta, os bradizoítos. Estes persistem dentro de quistos de parede fina durante a vida do hospedeiro intermediário, podendo ficar alojados em diversos tecidos, como o cérebro, o esqueleto ou os músculos. Se libertados dos quistos, os bradizoítos podem sofrer nova transformação em taquizoítos e provocar recrudescência da infecção em indivíduos imunodeficientes. Os quistos são considerados estágios infectantes tanto para os hospedeiros intermediários como para os definitivos (Montoya & Liesenfeld, 2004).

**Figura 6 – Ciclo de vida de *T. gondii*.**



Normalmente, os humanos infectam-se pela ingestão de quistos presentes em carne crua ou mal cozinhada, ou pela ingestão de outros alimentos e água contaminados com oocistos infectantes (Hill & Dubey, 2002, Meireles et al., 2004, Montoya & Liesenfeld, 2004, OIE, 2008). A contaminação do ambiente com oocistos é ampla, já que estes são eliminados nas fezes de gatos domésticos e outros felídeos. Os gatos domésticos são, provavelmente, a maior fonte de contaminação, pois a formação de oocistos nesta espécie é mais elevada. Geralmente, apenas cerca de 1% dos gatos numa população é que disseminam oocistos num dado momento no tempo. A infecção congénita, observada em humanos (Hill & Dubey, 2002, Rochette, 2003, Montoya & Liesenfeld, 2004, OIE, 2008), também pode ocorrer nos gatos, o que significa que os gatinhos infectados são outra fonte potencial de contaminação



por oocistos. Assim, as infecções por *T. gondii* nos gatos podem reflectir a taxa de infecção nas populações de roedores e de aves locais, uma vez que os gatos se infectam através da predação e ingestão desses animais (Hill & Dubey, 2002). Um estudo revelou que a seroprevalência de toxoplasmose em humanos estava correlacionada com a seroprevalência de *T. gondii* em cães e gatos errantes, sendo os últimos responsáveis pela contaminação ambiental (Meireles et al., 2004). Mesmo no meio aquático, já foram identificados mamíferos marinhos infectados, sugerindo a sobrevivência dos oocistos na água do mar. Aliás, o maior surto de toxoplasmose em humanos foi relacionado com a ingestão de água de um reservatório municipal no estado de British Columbia, no Canadá (Hill & Dubey, 2002). Suspeita-se que essa água tenha sido contaminada por oocistos excretados por pumas (*Felis concolor*). A infecção por *T. gondii* é comum em vários animais de produção de carne, como ovinos, suínos e lagomorfos, no entanto, nos bovinos e equinos parece ser menos prevalente. O parasita também é prevalente em animais selvagens, principalmente nos ursos negros e nos cervos da Virgínia. Nos EUA, aproximadamente 80% dos ursos negros estão infectados, e cerca de 60% dos guaxinins apresentam anticorpos para *T. gondii*. Como estas duas espécies escavam os solos para procurar alimentos, a infecção nos mesmos pode ser um bom indicador da prevalência de *T. gondii* no ambiente. Os hábitos culturais das populações também podem afectar a aquisição de infecção, nomeadamente hábitos de alimentação e de higiene, o que justifica a variação nas seroprevalências (Hill & Dubey, 2002, Montoya & Liesenfeld, 2004). Outra forma de transmissão de *T. gondii* é pela transfusão de sangue ou através de transplantes de órgãos, sendo a última mais importante. Este modo de transmissão pode ocorrer de duas maneiras, pela implantação de um órgão ou de medula óssea originário de um dador infectado num receptor não imune e imunodeficiente, ou alternativamente, pela indução da doença num indivíduo imunodeficiente infectado, cuja infecção estava latente. Em ambos os casos, o tratamento citotóxico e imunossupressivo do receptor do transplante é o factor principal que despoleta a reactivação da infecção com o surgimento da doença (Hill & Dubey, 2002).

Estima-se que até um terço da população mundial esteja infectada com *T. gondii* (Montoya & Liesenfeld, 2004). Em geral, a incidência varia com a população e a localização geográfica, registando-se valores de 16 a 40% na Grã-Bretanha (GB) e EUA, contrastando com taxas de 50 a 80% na Europa e nas Américas Central e do Sul (PAHO, 2001, Hill & Dubey, 2002). Em França, verificou-se que 84% das mulheres grávidas tinham anticorpos para *T. gondii*, enquanto que em Londres e Nova Iorque apenas 22% e 32% das mulheres gestantes apresentavam anticorpos, respectivamente (Hill & Dubey, 2002). Pensa-se que a taxa de infecção congénita ronde os 10 recém-nascidos por cada 10'000 nascimentos (PAHO, 2001).

A infecção por *T. gondii* já foi confirmada em cerca de 200 espécies de vertebrados, incluindo primatas, ruminantes, suínos, equinos, carnívoros, roedores, marsupiais,

insectívoros e numerosas aves. Tanto nos felinos domésticos, como nos silvestres, foi identificada a infecção pelo protozoário. No que respeita aos animais domésticos, foram identificadas taxas de prevalência altas em gatos, ovelhas, cabras e porcos, moderadas em cavalos e cães e baixas em bovinos (PAHO, 2001). Muitos estudos de campo e de laboratório foram realizados, em diversos países, com o objectivo de obter prevalências de toxoplasmose em diferentes espécies de animais, incluindo humanos (Tabela 10).

**Tabela 10** – Prevalências de infecção por *T. gondii* em diferentes espécies, em diversas regiões.

	Prevalência (%)	Região	Autores
Espécies silvestres			
Toirão ( <i>Mustela putonius</i> )	33	Europa	Meireles et al., 2004
Fuinha ( <i>Martes foina</i> )	18		
Marta ( <i>M. martes</i> )	17		
Raposa ( <i>V. vulpes</i> )	31		
Veado ( <i>C. elaphus</i> )	12		
Corço ( <i>C. capreolus</i> )	63		
Coelho bravo ( <i>O. cuniculus</i> )	21		
Espécies domésticas			
Gato	50-64	Bélgica e Holanda	Rochette, 2003
	42	Suécia	Meireles et al., 2004
	32-55	Alemanha	
	61,3	República Checa	
	45,5	Espanha	Montoya, Miró, Mateo, Ramírez & Fuentes, 2008
	35,8	Portugal (nordeste)	Lopes, Cardoso & Rodrigues, 2008
Cão	23	Suécia	Meireles et al., 2004
Suíños	15,6	Portugal	Sousa et al., 2006
Ovinos/suíños	50	Europa	PAHO, 2001
Humanos			
	16-40	EUA e GB	PAHO, 2001
	56,7	Espanha	
		50-80	Europa

## 2.2. Patogenia e Sintomas

A maioria das infecções em animais são clinicamente inaparentes, e naqueles que apresentam sintomas, o quadro clínico é semelhante ao observado nos humanos. Os casos são esporádicos, excepto nos ovinos e caprinos, em que as infecções congénitas são frequentes, bem como nos casos epizooticos pouco comuns nos suínos (PAHO, 2001).

Os cães podem desenvolver sinais facilmente confundíveis com esgana, ainda que raramente (PAHO, 2001), sendo os jovens mais afectados (Rochette, 2003). O cérebro e os pulmões são os órgãos mais susceptíveis, originando sintomas como debilidade generalizada, paraplegia, ataxia com tremores, hemiparesia e, por vezes, paralisia completa, pneumonia, corrimento nasal, tosse e dispneia (Rochette, 2003). Os efeitos da toxoplasmose são particularmente importantes nos pequenos ruminantes, devido à ocorrência de abortos e nascimentos de animais doentes, resultando em perdas económicas

significativas, especialmente na Austrália, GB e Nova Zelândia (NZ). A doença nos adultos é rara, mas os borregos infectados congenitamente apresentam falta de coordenação muscular e debilidade, sendo incapazes de se alimentarem sozinhos. Nos suínos, há registos de surtos com sintomas de pneumonia, encefalite e abortos (PAHO, 2001). Os gatos demonstram elevadas taxas de infecção, mas quer a infecção intestinal, quer a sistémica, tendem a ser assintomáticas. Particularmente nos gatos juvenis, foram observados sinais generalizados de infecção intestinal, encefálica e ocular. Gatos jovens, infectados experimentalmente, desenvolveram diarreia, hepatite, miocardite, miosite, pneumonia e encefalite. Outros animais de laboratório (coelhos, cobaias e outros) também contraíram a doença, por vezes, com um desfecho fatal (PAHO, 2001). A toxoplasmose também é bastante comum nas aves, embora raramente sintomática. Em casos agudos, foram encontrados focos necróticos no fígado, baço, pulmões e linfonodos (PAHO, 2001). Geralmente, *T. gondii* não provoca doença clínica em bovinos, camelídeos ou veados, mas pode ser fatal em primatas (*New World monkeys*), marsupiais e outras espécies, incluindo lebres (*Lepus europeus*, *L. timidus*), manus (*Felis manul*), raposas-do-Ártico e algumas aves e mamíferos. É considerada a hipótese de que estes animais tiveram uma exposição mínima a *T. gondii* no seu *habitat* natural, ao longo dos tempos, o que os tornou particularmente vulneráveis à doença (OIE, 2008).

Nos humanos, a linfadenomegália é o sintoma clínico mais frequente de toxoplasmose (Hill & Dubey, 2002, Montoya & Liesenfeld, 2004, OIE, 2008), que pode estar associado a febre, fadiga, mialgia, odinofagia e cefaleias. Apesar da doença poder ser benigna, o seu diagnóstico é muito importante nas mulheres gestantes, pelo risco de infecção congénita dos fetos. Indivíduos com o sistema imunitário debilitado ou suprimido podem apresentar encefalite, um sintoma que assume alguma importância na medida em que provoca as lesões mais graves. A infecção pode ocorrer em qualquer órgão, acompanhada de sintomas como cefaleias, desorientação, sonolência, hemiparesia, modificações nos reflexos, convulsões, ou ainda provocar um estado comatoso (Hill & Dubey, 2002).

### 2.3. Diagnóstico

O diagnóstico de toxoplasmose pode ser estabelecido através de testes sorológicos, amplificação de sequências específicas de ADN com métodos moleculares, demonstração histológica do parasita e/ou dos seus antígenos, ou pelo isolamento de *T. gondii*. Outros métodos raramente usados incluem a demonstração de antigenemia e de antígenos no soro e outros fluídos corporais, o teste dérmico de toxoplasmina e a transformação linfocitária específica para antígenos (Montoya, 2002). O método de flutuação aplicado em fezes de gatos com infecção intestinal permite detectar oocistos, mas geralmente com pouco sucesso (PAHO, 2001). A detecção sorológica de anticorpos específicos para *T. gondii* pode ser realizada por meio de diversos testes, nomeadamente, o teste de Sabin-Feldman (*Dye Test*

ou DT), IFI, AD, hemaglutinação indirecta (HAI), aglutinação em látex (AL), fixação do complemento (FC) (OIE, 2008), ELISA *sandwich* (IgM), ELISA (IgA ou IgE) (Montoya, 2002, OIE, 2008) e o teste AC/HS (Montoya, 2002, Montoya & Liesenfeld, 2004). O último é interpretado segundo a comparação entre os títulos de anticorpos obtidos com taquizoítos fixados com formalina (antigénio HS), e aqueles obtidos com taquizoítos fixados pela acetona (antigénio AC), o que permite diferenciar infecções agudas das crónicas (Montoya, 2002, Montoya & Liesenfeld, 2004). Os títulos de IgG, IgM, IgA e IgE podem dar informação sobre o tipo infecção presente, aguda ou crónica, uma vez que cada imunoglobulina tende a surgir em diferentes momentos após a infecção. Uma a duas semanas após a infecção aparecem IgG, com os seu pico um a dois meses depois, declinando lentamente e persistindo por toda a vida. No caso das IgM, geralmente aparecem antes das IgG e diminuem mais rapidamente que aquelas. Tanto as IgA como as IgE aparecem associadas a infecções recentes, mas as primeiras duram mais tempo (por vezes meses) e são mais sensíveis no diagnóstico de infecções congénitas em fetos e recém-nascidos (Montoya, 2002).

Nos humanos, o DT é o teste de eleição para detectar anticorpos específicos para *T. gondii*, por ter boas sensibilidade e especificidade, mas pode não ser fiável noutras espécies. Por outro lado, este teste implica a manipulação de formas vivas do parasita, colocando maior risco de infecção para os utilizadores. É uma técnica dispendiosa e exige pessoal tecnicamente especializado (OIE, 2008). A IFI é um método simples e amplamente usado, que utiliza taquizoítos inteiros inactivados para testar a presença de anticorpos para *T. gondii*. É relativamente barato e existem vários *kits* comerciais disponíveis no mercado. No entanto, pode ser difícil encontrar conjugados específicos para determinadas espécies, e há a possibilidade de ocorrência de reacções cruzadas com o factor reumatóide e anticorpos anti-nucleares (OIE, 2008). Outro teste simples e fácil de executar é a AD. Apresenta boas sensibilidade e especificidade, mas necessita de quantidades de antigénio relativamente maiores. Também existem diversos *kits* comerciais deste teste, aliás, uma versão de AL está disponível. A vantagem destes métodos consiste no facto de não serem específicos para a espécie, de modo que podem ser aplicados em amostras de virtualmente qualquer animal (OIE, 2008). Um estudo comparativo, efectuado com soros de gatos e cães (infectados naturalmente) provenientes de Itália, revelou que a IFI e um teste de aglutinação modificado (TAM) são equiparáveis quando aplicados rotineiramente em soros de gatos. Quando aplicados a amostras de cães, os mesmos autores concluíram que as duas técnicas não são comparáveis em termos de avaliar qualitativamente a presença/ausência de anticorpos IgG para *T. gondii*. Os autores acrescentam ainda que, para efeitos de rastreio sorológico, o TAM é mais adequado para detectar infecção nos gatos, mas não se adequa na testagem de soros de cães, devido à reduzida sensibilidade do teste nesta espécie (Macrì et al., 2009). Noutro estudo realizado no Brasil, a HAI demonstrou baixa sensibilidade

e falta de concordância na detecção de anticorpos (IgG) para *T. gondii* em soros de cães e, particularmente, de gatos errantes, quando comparada com o teste ELISA (Meireles et al., 2004).

No que respeita o teste ELISA, a sua utilização é simples e pouco complicada, e existe uma grande variedade de conjugados anti-espécie definidos, assim como substratos ou mesmo *kits* comerciais completos. A principal vantagem oferecida por esta técnica é a aplicação em larga escala, permitindo a análise de grandes quantidades de amostras. Com o efeito de melhorar a especificidade do ELISA, foram realizados testes que utilizam antígenos recombinantes ou purificados por afinidade com aplicação em ovinos. Recentemente, surgiu outro método que se correlaciona bem com o anterior, um ELISA cinético (KELA), que mede o grau de reacção entre o enzima e a solução de substrato (OIE, 2008).

A combinação de dois ou mais testes é, provavelmente, o meio de diagnóstico melhor para diferenciar entre infecções adquiridas recentemente e infecções crónicas (Montoya, 2002). Segundo Montoya (2002), no TSL-PAMFRI é seguida uma metodologia com base nos resultados combinados de diferentes testes sorológicos. Desse modo, soros positivos no DT, negativos nos testes de ELISA (IgM, IgA e IgE) e com um padrão crónico no teste AC/HS, são tipicamente encontrados em indivíduos infectados num passado distante. Adicionalmente, a associação de títulos elevados no DT, positivos nos ELISA (IgM, IgA e IgE) e com um padrão agudo no teste AC/HS, é altamente sugestiva duma infecção adquirida recentemente. Contrariamente, a presença de positividade no DT e no ELISA para IgM, com resultados negativos, fracos positivos, ou ambíguos nos ELISA para IgA e IgE, e também no teste AC/HS, é mais difícil de interpretar. Neste caso, uma segunda amostra deve ser recolhida para comparar os parâmetros resultantes entre as duas amostras, considerando-se uma infecção adquirida recentemente quando os resultados são significativamente diferentes, ou crónica se os títulos não variarem significativamente (Montoya, 2002).

Métodos moleculares, como a amplificação por PCR, são úteis para a detecção de ADN de *T. gondii* em fluídos corporais e tecidos, tendo tido sucesso no diagnóstico de toxoplasmose congénita, ocular, cerebral e disseminada (Montoya, 2002, Montoya & Liesenfeld, 2004). A sua utilização também permite o diagnóstico intra-uterino precoce, evitando outros procedimentos mais invasivos para o feto. Já foi identificado ADN do parasita em amostras de indivíduos com SIDA, nomeadamente em tecido cerebral, LCR, líquidos vítreo e aquoso, ou de lavagens bronco-alveolares (LBA) e sangue (Montoya, 2002). Uma investigação realizada na República Checa, em animais silvestres, utilizou o PCR para o diagnóstico de *T. gondii*, amplificando o gene B1, e considerou-o um dos testes mais específicos com boa sensibilidade. Neste estudo, a presença de ADN do parasita foi verificada em 2 de 152 raposas (*V. Vulpes*) analisadas. Os autores sugerem ainda o PCR como uma valiosa alternativa para estudos a realizar em tecidos de animais silvestres, já que nem sempre é

possível obter amostras de sangue para testes sorológicos nessas espécies (Hurková & Modrý, 2006).

A demonstração histológica de taquizóitos em secções de tecidos e em esfregaços (LCR, líquidos amniótico e de LBA) estabelece um diagnóstico de infecção aguda. A técnica de imunoperoxidase, que usa anti-soros para *T. gondii*, provou ser sensível e específica (Montoya, 2002, Montoya & Liesenfeld, 2004), mesmo quando aplicada em amostras não fixadas ou fixadas pela formalina e impregnadas em parafina (Montoya, 2002). Outra técnica pouco usada e bastante simples, consiste na coloração, pelo método de Wright-Giemsa, de lâminas de sedimento de LCR centrifugado, de aspirados de tecido cerebral ou de esfregaços por aposição de tecidos de biópsia (Montoya, 2002). O isolamento de *T. gondii* em amostras de sangue e outros fluídos corporais fornece um diagnóstico de infecção aguda (Montoya, 2002, Montoya & Liesenfeld, 2004), e permite fazer a tipagem acurada de estirpes do parasita (Montoya & Liesenfeld, 2004). Pode ser elaborada pela inoculação de ratos, mas também pela inoculação em culturas de células (Montoya, 2002).

#### 2.4. Tratamento

Nos gatos com sintomatologia clínica, o tratamento pode ser efectuado com a administração de clindamicina 25 mg/kg, BID, PO, aumentando gradualmente a dose para 50 mg/kg, BID, PO. Esta terapêutica deve durar pelo menos 2 semanas e a ingestão de comida deve ser monitorizada, pois há tendência para a inapetência. Em alternativa, pode administrar-se fosfato de clindamicina por via IM (12,5-25 mg/kg, BID), ou pirimetamina (0,25-0,5 mg/kg, BID, PO) com sulfonamida (30 mg/kg, BID, PO), ou ainda trimetoprim e sulfadiazina (15 mg/kg, BID, PO) ao longo de 4 semanas (Bowman, 1999).

Adultos imunocompetentes e crianças com linfadenite toxoplásmica normalmente não necessitam de tratamento, excepto quando os sintomas são graves ou persistentes. Em humanos, a combinação de pirimetamina, sulfadiazina e ácido fólico, durante 4 a 6 semanas, é o tratamento mais utilizado (Hill & Dubey, 2002, Montoya & Liesenfeld, 2004). É de notar que estes fármacos têm uma acção benéfica durante a fase aguda da doença, em que há multiplicação do parasita, mas geralmente têm pouco efeito em infecções subclínicas e não erradicam a infecção (Hill & Dubey, 2002). Também a espiramicina e a clindamicina podem ser usadas no tratamento da toxoplasmose (Hill & Dubey, 2002, Montoya & Liesenfeld, 2004). Paralelamente, infecções adquiridas em acidentes de laboratório ou através de transfusões de produtos sanguíneos são potencialmente graves, razão pela qual a terapêutica deve ser sempre aplicada nestes casos (Montoya & Liesenfeld, 2004).

#### 2.5. Prevenção

O desconhecimento da incidência de infecção congénita em humanos, as incertezas sobre a eficácia dos testes sorológicos, cujas sensibilidade e especificidade ainda não estão bem

definidas, e as dúvidas inerentes à eficiência de alguns fármacos no tratamento da toxoplasmose, têm promovido a implementação de programas de rastreio da doença em vários países (Montoya & Liesenfeld, 2004).

A prevenção da toxoplasmose pelos humanos passa, sobretudo, pela adopção de medidas e cuidados de higiene a ter no dia a dia. Apesar dessas medidas se aplicarem a qualquer pessoa, as mulheres gestantes e os indivíduos imunodeficientes merecem especial atenção, pela possibilidade de infecção congénita e pelo risco de desenvolver doença grave, respectivamente. A educação sanitária deve ser dirigida a populações de alto risco, e basear-se no ensino de atitudes que evitem a ingestão de carne crua ou mal cozinhada (PAHO, 2001). Pessoas que manipulam produtos cárneos devem lavar correctamente as mãos, com água e sabão, antes de iniciarem outras tarefas (PAHO, 2001, Hill & Dubey, 2002). Todo o equipamento usado nesse manuseio (tábuas de corte, lavatórios, facas e outros utensílios) deve ser igualmente lavado com água e sabão. As formas enquistadas são destruídas pelo aquecimento da carne a 67°C (Hill & Dubey, 2002) ou pelo seu arrefecimento a -15°C a -20°C durante 3 dias (PAHO, 2001, Rochette, 2003), mas também pela exposição a radiação gama (0,5 kilorads) (Hill & Dubey, 2002). Às mulheres gestantes e pessoas imunodeficientes, em particular, recomenda-se que evitem o contacto com gatos (incluindo a limpeza da caixa de areia), solos e carnes cruas. Os animais domésticos não devem ser alimentados com carnes cruas ou mal cozinhadas, sendo as rações secas uma boa alternativa. Na preparação dos vegetais, aconselha-se a sua lavagem minuciosa ou cozedura. As actividades de jardinagem devem ser realizadas com luvas de protecção (PAHO, 2001, Hill & Dubey, 2002). O controlo de moscas e insectos rastejantes contribui também para a prevenção do transporte mecânico de oocistos (PAHO, 2001).

A prevenção da infecção em ovinos e suínos requer o afastamento de gatos e outros felinos assilvestrados dos estábulos e pastos, o que nem sempre é fácil. A inspecção nos matadouros, por médicos veterinários competentes, deveria ser considerada para o controlo da toxoplasmose (PAHO, 2001).

A descoberta duma vacina eficaz contra a infecção por *T. gondii*, em humanos, ainda está por acontecer (Hill & Dubey, 2002, Montoya & Liesenfeld, 2004). A investigação com o objectivo de produzir vacinas para gatos, ovinos e suínos tem sido desenvolvida durante anos (PAHO, 2001). Na Europa (Reino Unido, Irlanda, França, Portugal e Espanha) e na NZ já foi licenciado o uso duma vacina viva atenuada da estirpe S48 do parasita, para aplicação apenas em ovinos (PAHO, 2001, Montoya & Liesenfeld, 2004, OIE, 2008). Na esperança de mimetizar a imunidade de longa duração conferida pela infecção natural, são testados antigénios superficiais de *T. gondii* purificados ou recombinantes, mas também estirpes vivas atenuadas ou mutantes, ou ADN com plasmídeos codificadores de factores de estimulação de produção de colónias (Montoya & Liesenfeld, 2004).

## **Capítulo IV. Rastreo sorológico de alguns agentes de zoonoses em canídeos silvestres no Norte de Portugal**

### **1. Objectivos**

Este estudo transversal teve como objectivo principal a realização de um rastreo sorológico de vários agentes patogénicos para os canídeos, com o intuito de ficar a conhecer as percentagens de animais que contactaram, em algum momento das suas vidas, com esses agentes, na região norte de Portugal. Pretendeu-se ainda estabelecer eventuais relações entre as prevalências obtidas e factores como a espécie de hospedeiro, sexo, idade e origem geográfica, bem como o tipo de amostra utilizada e o seu estado de conservação.

### **2. Materiais e Métodos**

#### **2.1. Colheita de amostras e enquadramento geográfico**

Durante um período longo, entre Fevereiro de 1995 e Março de 2009, colheram-se 90 amostras de canídeos silvestres ( 50 de *C. lupus* e 40 de *V. vulpes*) provenientes de diversas regiões do norte de Portugal (Anexo C). As amostras tinham origem em animais do CRFS, capturados e encontrados mortos. As áreas de estudo abrangidas incluíram 7 distritos de Portugal, nomeadamente, Braga, Bragança, Guarda, Porto, Viana do Castelo, Vila Real e Viseu. Das 90 amostras obtidas, 19 são soros, 70 correspondem a extractos de pulmão (*lung tissue extract*/LTE) e apenas uma a exsudado da cavidade torácica.

Aos animais capturados em vida, fez-se a colheita de sangue para tubos secos, a partir de uma veia periférica (veia cefálica ou safena). Após a coagulação do sangue, procedeu-se à sua centrifugação a 2000 rpm durante 10 minutos e separou-se a fracção de soro para outros tubos, que foram armazenados a -20°C. A maior parte dos soros foram obtidos pela sedimentação de sangue intra-cardíaco recolhido logo após a morte do animal, e armazenados do mesmo modo.

As restantes amostras foram retiradas de cadáveres de animais submetidos a necrópsia. O único exsudado foi colhido da cavidade torácica de um lobo sujeito a necrópsia para um tubo seco e guardado a -20°C. Os LTE obtiveram-se através de porções de pulmão colhidas no acto da necrópsia. Para esse efeito, cortaram-se cerca de 2 g de tecido pulmonar em 4 a 5 fragmentos, colocados num tubo com 1 ml de PBS (pH 7,2) e deixados a repousar, durante 20 minutos, à temperatura ambiente. Após esse período de tempo, agitou-se o tubo durante 4 minutos e procedeu-se à sua centrifugação a 800 G, durante 10 minutos. Removeram-se os fragmentos de tecido pulmonar, permanecendo apenas o sobrenadante, que foi armazenado a -20°C durante pelo menos 24 horas. Descongelou-se novamente a amostra, que foi deixada em banho-maria a 56°C durante 30 minutos, após o qual foi



submetida a uma segunda centrifugação a 800 G, por 10 minutos. Depois deste procedimento, recolheu-se o sobrenadante e armazenou-se num tubo a -20°C.

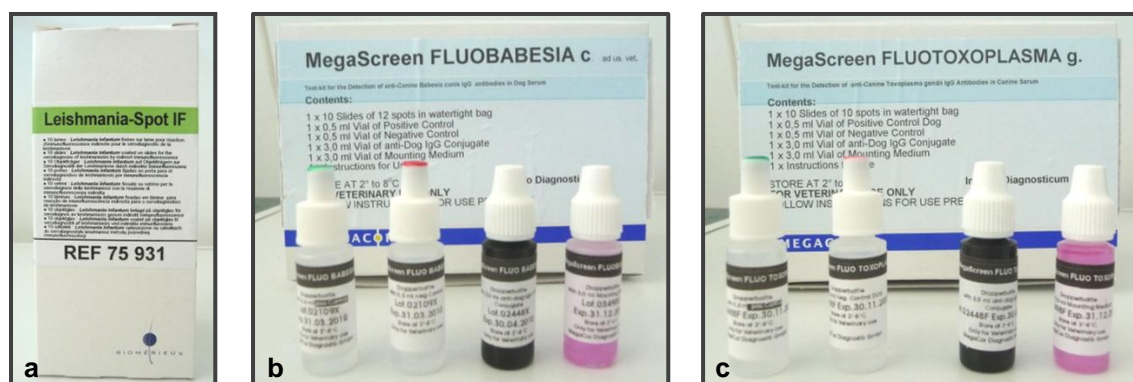
Todas as amostras foram utilizadas para a realização de ensaios sorológicos, designadamente as técnicas de imunofluorescência indirecta, aglutinação em placa e imunomigração rápida (IMR).

## 2.2. Imunofluorescência Indirecta

A técnica de IFI foi utilizada com o intuito de detectar e titular anticorpos de *B. burgdorferi* s.l., *E. canis*, *A. phagocytophilum*, *R. conorii*, *L. infantum*, *B. canis*, TOSV e *T. gondii* nas amostras dos canídeos em estudo.

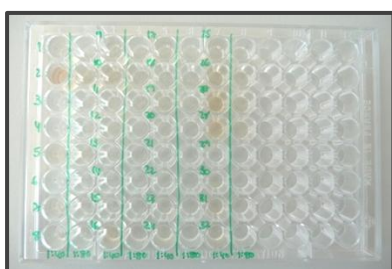
As lâminas de *L. infantum*, *B. canis* e *T. gondii* tiveram origem comercial (Leishmania-Spot IF, bioMérieux®, França; MegaScreen® FLUOBABESIA canis e MegaScreen® FLUOTOXOPLASMA g., Megacor, Áustria, respectivamente), e foram seguidos os protocolos do fabricante (Figura 7, protocolos nos Anexos E, F e G, respectivamente).

**Figura 7** – Testes comerciais de IFI, para detecção de anticorpos específicos contra *L. infantum* (a), *B. canis* (b) e *T. gondii* (c).



As lâminas de *B. burgdorferi* s.l., *E. canis*, *A. phagocytophilum*, *R. Conorii* e TOSV foram produzidas no laboratório do CEVDI por técnicos especializados, e seguiu-se o protocolo aí utilizado. Imediatamente antes da realização do teste de IFI, as lâminas foram descongeladas, removeu-se o excesso de humidade por secagem, e fixaram-se as mesmas em acetona, durante 10 minutos, período após o qual foram novamente secas. Em todas as lâminas reservaram-se os primeiros três poços para o controlo positivo (antigénio + soro testemunha positivo), branco (antigénio + PBS) e controlo negativo (antigénio + soro

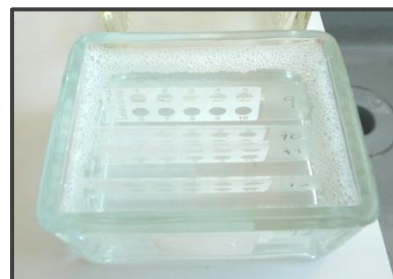
**Figura 8** – Placa com diluições de várias amostras.



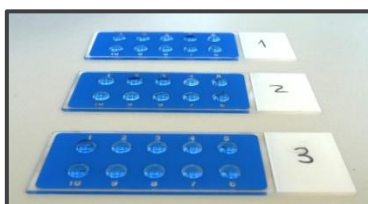
testemunha negativo). Os controlos usados tinham origem humana, excepto o controlo positivo para TOSV, com origem murina, e o controlo positivo para *E. canis*, proveniente de cães domésticos. Cada uma das amostras foi diluída com PBS (Figura 8) e testada nas diluições respectivas para os agentes em estudo (Tabela 11). Procedeu-se à colocação de 10-15 µL (consoante o tamanho do poço) de amostra a

testar em cada poço, de modo a cobrir todo o antígeno presente no círculo. Incubaram-se as lâminas em câmara húmida a 37°C, durante 30 minutos. De seguida, as lâminas foram lavadas 2 vezes com PBS durante 5 minutos cada, sempre em agitação. Passaram-se por água destilada (evitando a deposição de sais sobre o antígeno, Figura 9) e retirou-se-lhes o excesso de humidade. Procedeu-se à diluição do conjugado (de acordo com o protocolo do lote) e colocaram-se 10-15 µL de conjugado em cada poço (Figura 10). Seguiu-se nova incubação de 30 minutos a 37°C, em câmara húmida. Efectuou-se o mesmo procedimento para a lavagem das lâminas e, após a última secagem, depositaram-se algumas gotas de glicerina tamponada sobre cada lâmina e cobriram-se as mesmas com uma lamela cada, tendo o cuidado de eliminar eventuais bolhas de ar.

**Figura 9** – Lavagem das lâminas em água destilada.



**Figura 10** – Lâminas com conjugado em cada poço.



Todas as lâminas foram observadas num microscópio de fluorescência com uma ampliação de 400x. A leitura da reacção de fluorescência foi feita no centro dos poços, onde estavam concentrados os antígenios. A observação de formas de antígeno características com fluorescência verde-maçã brilhante foi considerada positiva, enquanto que os resultados negativos surgiram como um campo escuro com células de cultura coradas de vermelho.

**Tabela 11** – Diluições das amostras analisadas para cada agente etiológico e respectivos valores do limiar de positividade (*cut-off*) aplicados.

Agente etiológico	Cut-off	Diluições seriadas
<i>A. phagocytophilum</i>	1:64	1:32, 1:64, 1:128, 1:256
<i>B. burgdorferi</i>	1:64	1:32, 1:64
<i>E. canis</i>	1:64	1:32, 1:64, 1:128
<i>R. conorii</i>	1:128	1:64, 1:128, 1:256
<i>B. canis</i>	1:80	1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320
<i>L. infantum</i>	1:80	1:40, 1:80
Vírus Toscana	1:32	1:16, 1:32
<i>T. gondii</i>	1:80	1:80

### 2.3. Aglutinação em Placa

A prova de aglutinação em placa das amostras dos canídeos em estudo teve como objectivo a detecção e titulação de anticorpos anti-*F. tularensis*. O antígeno usado nesta técnica teve origem comercial (*Francisella tularensis* Antigen, Becton, Dickinson and Co, Sparks®, EUA) (Figura 11), por isso seguiu-se o protocolo do fabricante. Prepararam-se placas de aglutinação de seis poços, reservando os dois primeiros para os controlos positivo e negativo. Procedeu-se à diluição de 1:20, colocando-se 80 µL de amostra a testar em cada poço e adicionando uma gota do antígeno comercial, mantendo uma agitação ligeira

**Figura 11** – Teste de aglutinação em placa para detecção de anticorpos contra *F. tularensis*.



durante um minuto. Em seguida, as amostras lidas como positivas (presença de aglutinação com células no fundo dos poços da placa) seriam sucessivamente repetidas para uma diluição superior de 1:40 e 1:80, colocando 40  $\mu$ L e 20  $\mu$ L de amostra, respectivamente, seguindo o procedimento referido acima. A leitura do padrão de aglutinação foi feita com base na maior diluição com aglutinação, estabelecendo-se aí o título final (*cut-off* de 1:80). Os

poços onde não se observou qualquer tipo de reacção foram considerados negativos para o teste.

## 2.4. Imunomigração Rápida

O teste de IMR serviu para detectar a presença de antígenos de *D. immitis* solúveis nas amostras dos canídeos sob estudo. O teste, de origem comercial (WITNESS Dirofilaria, Synbiotics Europe®, França) (Figura 12), foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante (Anexo H). Para cada amostra, colocou-se uma gota da mesma na primeira membrana, seguida de 3 gotas da solução reagente, permitindo que a reacção ocorresse durante 10 minutos. Após esse período de tempo, procedeu-se à leitura das bandas de cor. Consideraram-se positivos os testes que apresentassem duas bandas cor de rosa, correspondentes às janelas de resultado e de controlo. Nos testes negativos surgiu apenas uma banda cor de rosa na janela de controlo.

**Figura 12** – Teste de IMR para detectar antígenos de *D. immitis*.



## 2.5. Necrópsias

Durante os meses de Outubro, Novembro e Dezembro de 2008, realizaram-se 12 necrópsias de cadáveres de canídeos silvestres com interesse para o estudo, dos quais 3 de *C. lupus* e 9 de *V. Vulpes* (Figura 13). Os lobos foram submetidos a necrópsia no

**Figura 13** - Cadáver de raposa, antes da sua necrópsia.



Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV) do Porto, no âmbito do Sistema de Monitorização de Lobos Mortos (SMLM) e com a assistência das patologistas responsáveis nesse laboratório. Paralelamente, as necrópsias das raposas foram efectuadas no laboratório do PNPG. As necropsias seguiram uma metodologia relativamente constante, tendo sido

colhidas várias amostras de tecidos e órgãos para estudos posteriores, como análise genética e microbiológica, pesquisa de parasitas gastro-intestinais e pesquisa de *Trichinella* sp.. No âmbito do corrente estudo, foram colhidas 16 amostras para sorologia, nomeadamente 9 LTE correspondentes às 9 raposas, um soro de uma raposa, 3 LTE provenientes dos 3 lobos, 2 soros de 2 lobos e um exsudado de um dos lobos sujeitos a necrópsia.

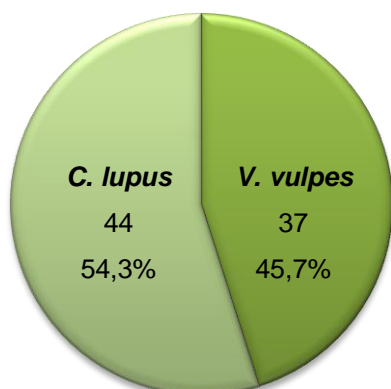
## **2.6. Métodos Estatísticos**

A determinação de prevalências foi um dos objectivos fulcrais deste trabalho. Para tal, foi necessário recorrer à análise estatística dos dados obtidos sobre a população de canídeos silvestres em estudo, usando o programa *Microsoft Office Excel 2007* para o efeito. As prevalências foram calculadas com base na relação dos resultados seropositivos em função da totalidade das amostras, maioritariamente por comparação simples de frequências absolutas e relativas. Pretendeu-se também determinar possíveis factores de risco para o desenvolvimento das doenças estudadas, segundo os resultados das seroprevalências. Deste modo, investigaram-se eventuais associações estatísticas entre as prevalências determinadas para cada agente etiológico e as variáveis espécie de hospedeiro, sexo, idade, distrito de origem e estado de conservação das amostras. Recorreu-se ao Teste de Qui-quadrado de Pearson ( $\chi^2$ ), com valor de  $p < 0,05$  como valor significativo. Sempre que houve violação do fundamento do Qui-quadrado, foi aplicado o Teste Exacto de Fisher ou a sua generalização para tabelas de maior dimensão. Para este efeito, utilizou-se a plataforma de cálculo VassarStats disponível na *internet* (Lowry, 2008).

### 3. Resultados

As 90 amostras colhidas (50 de *C. lupus* e 40 de *V. vulpes*) correspondem a 44 lobos e 37 raposas ( $n=81$  indivíduos), o que, em termos percentuais, significa uma proporção de 54,3% lobos e 45,7% raposas (Gráfico 5). Esta discrepância entre o número de amostras e o número de indivíduos prende-se com o facto de ter sido colhida mais do que uma amostra em 4 lobos e 3 raposas do conjunto total (Tabela 12).

**Gráfico 5** – Número de lobos e raposas avaliados.



**Tabela 12** – Número de amostras colhidas de cada espécie e frequências relativas no conjunto total.

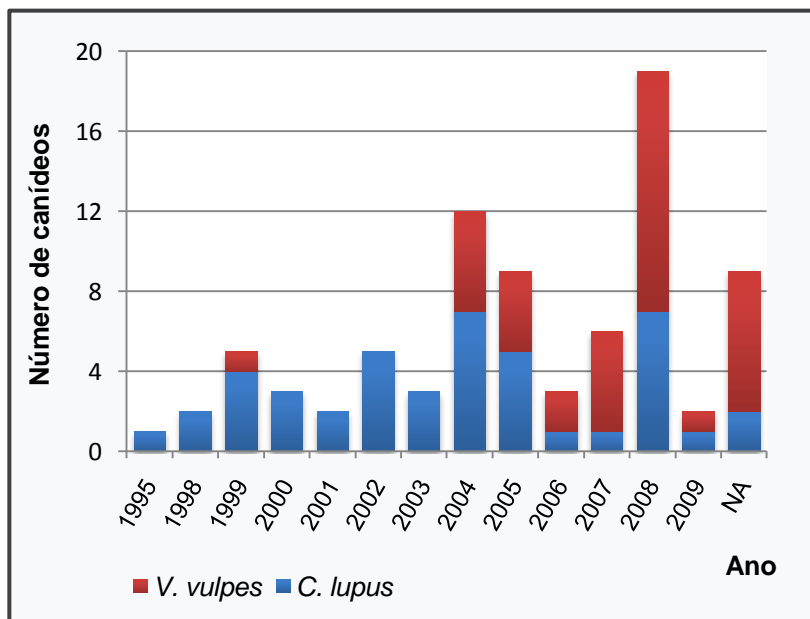
Amostras colhidas	<i>C. lupus</i>	<i>V. vulpes</i>
Soro	3	8
LTE	36	26
LTE + soro	4	3
LTE + soro + exsudado	1	0
Total	44	37

Tipo de amostra	Número	
Soro	19	21,1%
LTE	70	77,8%
Exsudado	1	1,1%
Total	90	100,0%

Observando o Gráfico 6 e a Tabela 13, verifica-se que durante o período de recolha das amostras, o ano de 2008 contribuiu com maior número de animais capturados (lobos,  $n=7$ ), particularmente raposas ( $n=12$ ). Contrastando com estes valores, em 1995 apenas se recolheu um lobo. Mais recentemente, em 2009, foram capturados dois animais mortos, no entanto, neste ano apenas se contabilizou o primeiro trimestre. Existem ainda 9 animais cuja data de recolha se desconhece.

**Gráfico 6** – Número de animais recolhidos ao longo do tempo.



**Tabela 13** – Número de canídeos recolhidos por cada ano.

Ano	Cl	Vv	Total
1995	1	0	1
1998	2	0	2
1999	4	1	5
2000	3	0	3
2001	2	0	2
2002	5	0	5
2003	3	0	3
2004	7	5	12
2005	5	4	9
2006	1	2	3
2007	1	5	6
2008	7	12	19
2009	1	1	2
NA	2	7	9
Total	44	37	81

Cl - *C. lupus*, Vv - *V. vulpes*,  
NA - não atribuído

Como foi referido anteriormente, as áreas de estudo abrangeram 7 distritos do norte de Portugal, nomeadamente, Braga, Bragança, Guarda, Porto, Viana do Castelo, Vila Real e Viseu (Tabela 14). No distrito de Viana do Castelo foi capturado o maior número de canídeos ( $n=20$ ), seguido dos distritos de Bragança ( $n=16$ ), Vila Real ( $n=15$ ), Braga ( $n=11$ ), Viseu ( $n=7$ ), Guarda ( $n=4$ ) e Porto ( $n=1$ ). Adicionalmente, recolheram-se 7 animais, cuja origem geográfica é desconhecida.

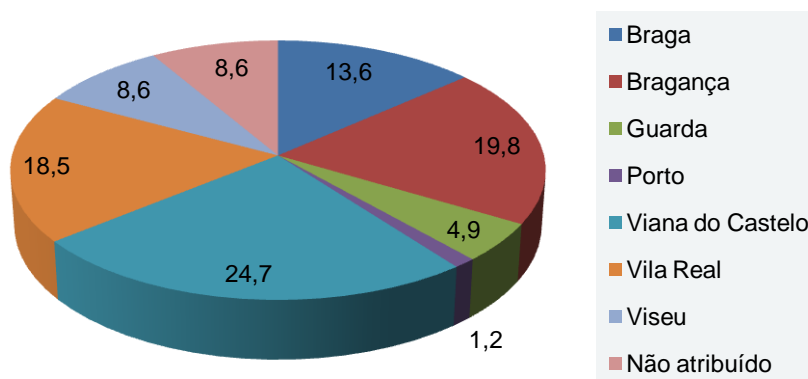
**Tabela 14** – Distribuição do número de lobos e raposas recolhidos por distrito e concelhos respectivos.

<b>Distrito / Concelho</b>	<b><i>C. lupus</i></b>	<b><i>V. vulpes</i></b>	<b>Total</b>	<b>Total percentual</b>
<b>Braga</b>	<b>2</b>	<b>9</b>	<b>11</b>	<b>13,6%</b>
Fafe	1	0		
Guimarães	0	1		
Póvoa de Lanhoso	0	1		
Terras de Bouro	1	4		
Vieira do Minho	0	2		
Vizela	0	1		
<b>Bragança</b>	<b>12</b>	<b>4</b>	<b>16</b>	<b>19,8%</b>
Bragança	5	0		
Miranda do Douro	1	0		
Mirandela	1	0		
Mogadouro	2	0		
Torre de Moncorvo	1	0		
Vimioso	1	0		
Vinhais	1	0		
NA	0	4		
<b>Guarda</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4,9%</b>
Figueira de Castelo Rodrigo	0	1		
Sabugal	0	2		
NA	0	1		
<b>Porto</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1,2%</b>
Vila do Conde	0	1		
<b>Viana do Castelo</b>	<b>7</b>	<b>13</b>	<b>20</b>	<b>24,7%</b>
Arcos de Valdevez	3	4		
Melgaço	2	7		
Monção	1	0		
Ponte da Barca	1	1		
Ponte de Lima	0	1		
<b>Vila Real</b>	<b>14</b>	<b>1</b>	<b>15</b>	<b>18,5%</b>
Alijó	1	0		
Boticas	2	0		
Chaves	2	0		
Mondim de Basto	1	0		
Montalegre	6	1		
Vila Pouca de Aguiar	1	0		
Vila Real	1	0		
<b>Viseu</b>	<b>7</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>8,6%</b>
Cinfães	1	0		
Moimenta da Beira	3	0		
Satão	1	0		
Vila Nova de Paiva	2	0		
<b>Origem não atribuída (NA)</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>8,6%</b>



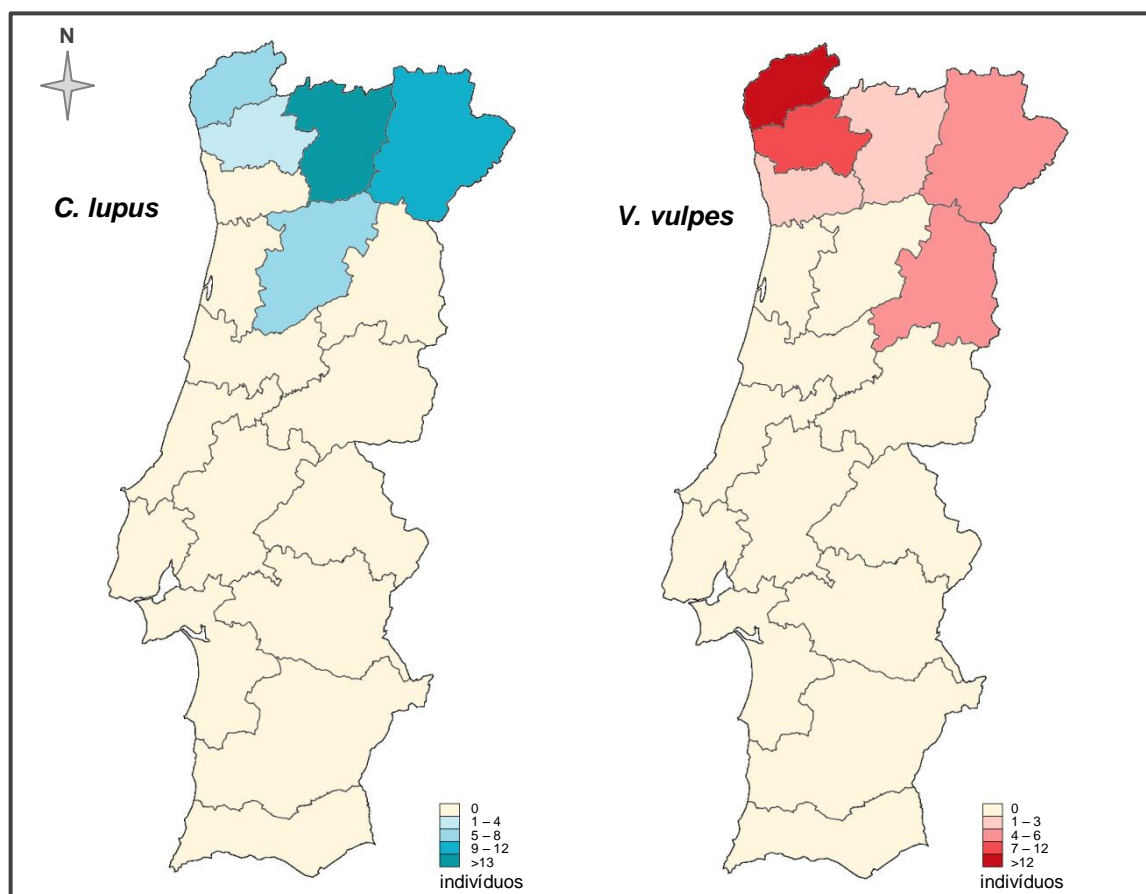
O Gráfico 7 apresenta a distribuição dos canídeos analisados, verificando-se que o distrito de Viana do Castelo abrange cerca de um quarto do total de animais. Apesar de existirem algumas amostras provenientes da margem sul do rio Douro, pode constatar-se que a grande maioria dos animais teve origem em distritos a norte do rio Douro, o que se justifica pelo facto do CRFS do PNPG servir maioritariamente essa área geográfica.

**Gráfico 7** – Distribuição dos canídeos, de acordo com os distritos de origem (valores em %).



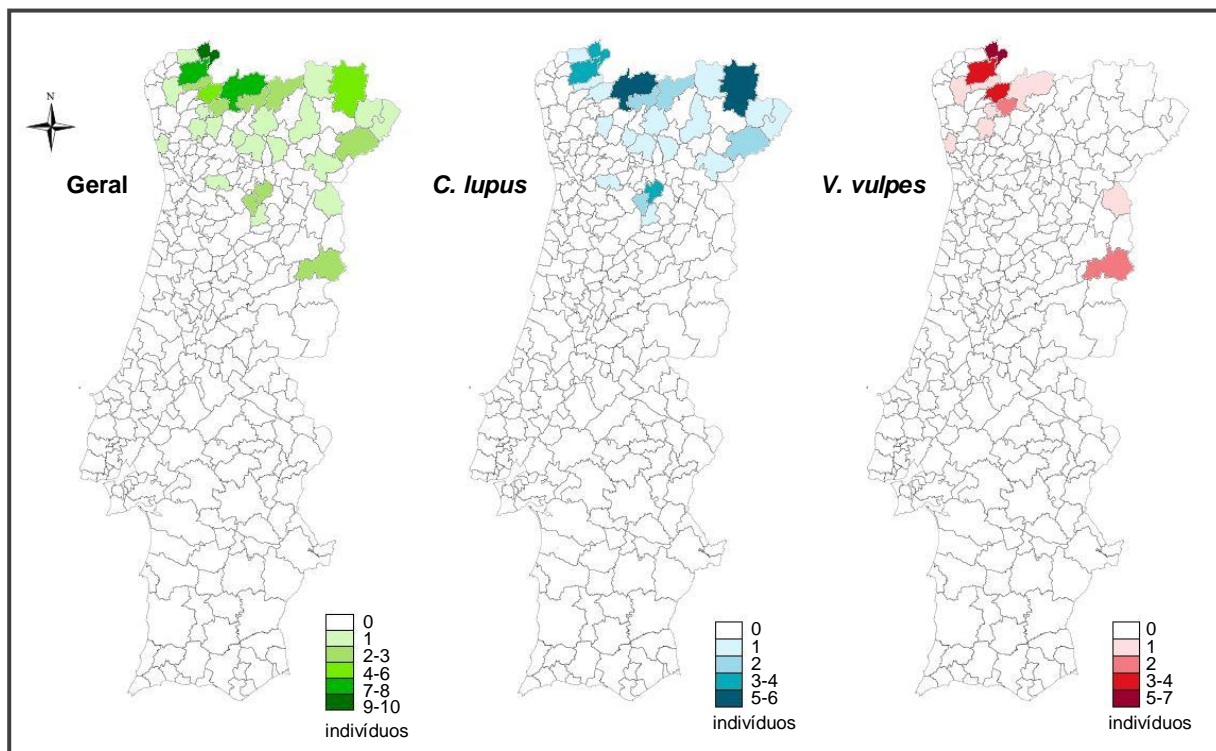
Por outro lado, e observando agora os mapas (Figura 14) da distribuição de lobos e raposas, parece haver uma maior frequência de lobos provenientes do nordeste de Portugal (distritos de Vila Real e Bragança), contrariando a tendência de distribuição das raposas mais a noroeste do país (distritos de Viana do Castelo e Braga).

**Figura 14** – Origem geográfica dos lobos (à esquerda) e raposas (à direita) estudados, por distritos.



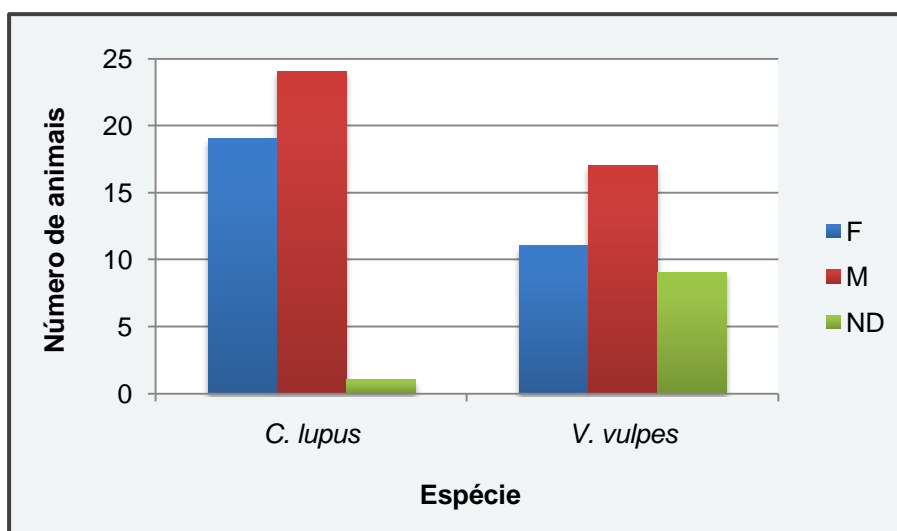
Se analisarmos a distribuição dos canídeos por concelhos (Figura 15), verificamos que o mesmo fenómeno acontece, sendo que os concelhos de Bragança ( $n=5$ ) e Montalegre ( $n=6$ ) são os que apresentam maior número de lobos, enquanto que o concelho de Melgaço ( $n=7$ ) possui maior número de raposas.

**Figura 15** – Mapas com as origens geográficas dos canídeos em geral e por espécie, por concelhos.



Atendendo ao sexo dos canídeos (Gráfico 8), quer nos lobos quer nas raposas, o número de machos recolhidos foi maior do que o de fêmeas ( $n=24$  vs.  $n=19$  para *C. lupus* e  $n=17$  vs.  $n=11$  para *V. vulpes*). É de salientar ainda que num número considerável de raposas ( $n=9$ ) não se obteve informação sobre o sexo dos animais.

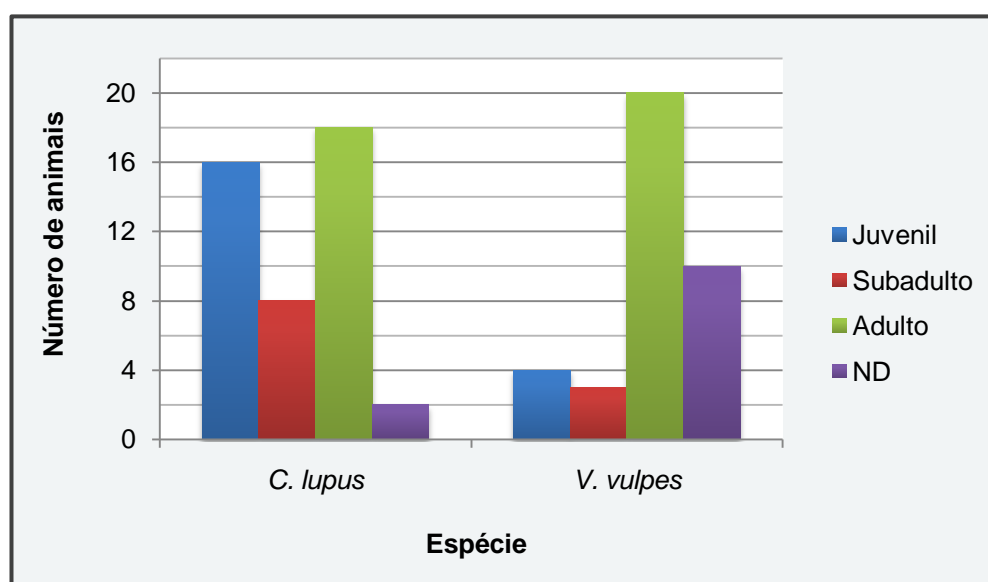
**Gráfico 8** – Número de fêmeas (F) e machos (M) de cada espécie (ND=não determinado).





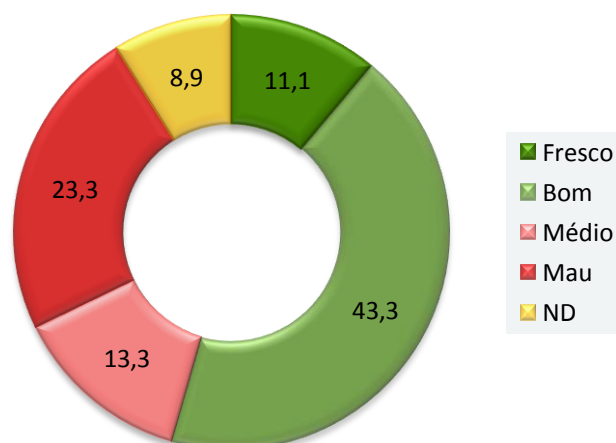
No que respeita às idades dos animais, foi estabelecida uma classificação em “juvenil” (até 6 meses), “subadulto” (1-2 anos) e “adulto” (mais de 2 anos), apesar desta escala ter sido usada com alguma subjectividade. Em ambas as espécies, os adultos foram mais frequentes, seguidos dos juvenis (particularmente nos lobos). Também aqui se verificou um número significativo de raposas ( $n=10$ ) sobre as quais não se conhecia a idade (Gráfico 9).

**Gráfico 9** – Número de canídeos, segundo o grupo etário a que pertencem (ND=não determinado).



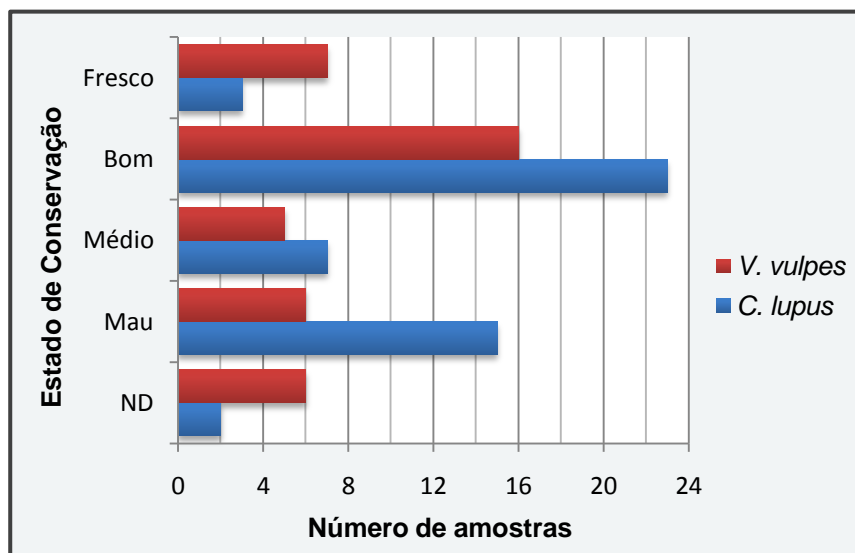
Quanto ao estado de conservação das amostras recolhidas, de um modo geral, pode dizer-se que a maior parte das amostras se encontrava em boas condições. As amostras foram divididas em vários estados desde “mau” e “médio”, dentro duma categoria de pior estado de conservação, a “bom” e “fresco”, numa categoria de melhor estado de conservação. Assim, pode observar-se no Gráfico 10 que pouco mais de metade das amostras apresentaram boas ou excelentes condições de conservação (a verde), para ambas as espécies de canídeos.

**Gráfico 10** – Estado de conservação do total das amostras, em percentagem (ND=não determinado).



É também evidente a predominância de amostras em estado de conservação “bom” tanto nos lobos ( $n=23$ ) como nas raposas ( $n=16$ ), apesar de na primeira espécie haver uma fracção razoável de amostras em estado “mau” ( $n=15$ ) (Gráfico 11).

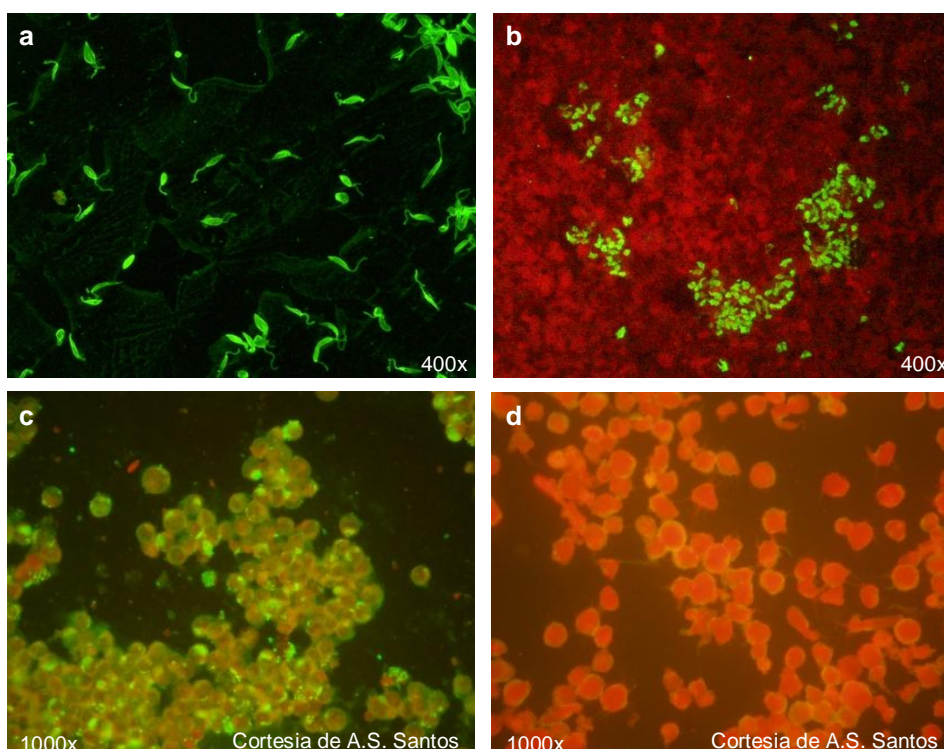
**Gráfico 11** – Estado de conservação das amostras, em cada espécie (ND=não determinado).



### 3.1. Imunofluorescência Indirecta

Os testes de IFI foram realizados em dois laboratórios distintos, sendo que o total das 90 amostras foi analisado no laboratório de Parasitologia da FMV, para anticorpos (IgG) contra os agentes *B. canis* e *L. infantum* (Figura 16).

**Figura 16** – Imagens de microscopia obtidas através de IFI de *L. infantum* (a), *B. canis* (b) e *A. phagocytophilum* (c-positivo, d-negativo).



Contudo, na detecção de anticorpos contra *T. gondii* só foi possível testar 86 amostras (excluíram-se 4 LTE de *V. vulpes*). Nos laboratórios do CEDVI, apenas 88 amostras foram avaliadas (excluíram-se 2 soros, um de *C. lupus* e outro de *V. vulpes*, pela pequena quantidade de amostra disponível) para anticorpos (IgG) contra os agentes *A. phagocytophilum* (Figura 16), *B. burgdorferi* s.l., *E. canis*, *R. conorii* e TOSV.

Assim, a Tabela 15 apresenta as frequências absolutas e relativas dos resultados obtidos por IFI para cada agente etiológico, observando-se um número de casos positivos superior na detecção de anticorpos anti-*R. conorii* ( $n=11$ , indicado a verde), contrastando com a ausência de positividade para anticorpos contra *L. infantum* e TOSV (indicados a vermelho).

**Tabela 15** – Distribuição de frequências absolutas e relativas dos resultados obtidos por IFI para cada agente etiológico.

Agente etiológico	<i>C. lupus</i>		<i>V. vulpes</i>		Total		N	Amostras analisadas
	P	N	P	N	P (%)	(%)		
<i>A. phagocytophilum</i>	1	48	0	39	1	(1,14)	87	88
<i>B. burgdorferi</i> s.l.	1	48	0	39	1	(1,14)	87	
<i>E. canis</i>	1	48	1	38	2	(2,27)	86	
<i>R. conorii</i>	8	41	3	36	11	(12,5)	77	
TOSV	0	49	0	39	0	(0)	88	
<i>B. canis</i>	1	49	1	39	2	(2,22)	88	90
<i>L. infantum</i>	0	50	0	40	0	(0)	90	
<i>T. gondii</i>	0	50	4	32	4	(4,65)	82	86

P=positivo; N=negativo

No que respeita aos níveis de anticorpos, algumas amostras revelaram títulos elevados de IgG, enquanto outras ficaram pelo limiar de positividade respectivo (Tabela 16). Em relação à titulação de anticorpos anti-*T. gondii*, uma vez que apenas foi possível diluir as amostras a 1:80, não se pode inferir sobre os verdadeiros níveis de anticorpos presentes naquelas amostras.

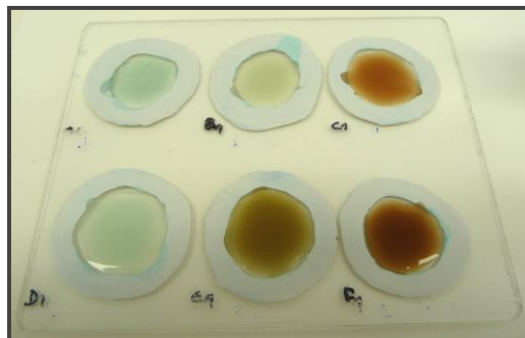
**Tabela 16** – Títulos finais de anticorpos obtidos para cada agente patogénico, segundo a espécie de canídeo.

Agente etiológico	Títulos finais	<i>C. lupus</i>	<i>V. vulpes</i>
<i>A. phagocytophilum</i>	128	1	
<i>B. burgdorferi</i> s.l.	64	1	
<i>E. canis</i>	128 ( $n=2$ )	1	1
<i>R. conorii</i>	128 ( $n=6$ )	3	3
	256 ( $n=5$ )	5	
<i>B. canis</i>	160 ( $n=1$ )		1
	320 ( $n=1$ )	1	
<i>T. gondii</i>	80 ( $n=4$ )		4

### 3.2. Aglutinação em Placa

O teste de aglutinação em placa (Figura 17) foi efectuado em apenas 64 amostras, uma vez que, das 88 amostras disponíveis para análise, 24 (todas correspondiam a LTE) esgotaram-se e não foi possível avaliar a presença de anticorpos contra *F. tularensis* nas mesmas. No total das amostras analisadas, 2 foram suspeitas para a reacção de aglutinação na diluição 1:20, ambas pertencentes a lobos, das quais uma revelou ainda suspeitas de aglutinação nas diluições seguintes, 1:40 e 1:80.

**Figura 17** – Placa de aglutinação para diluições 1:20 em amostras de canídeos.



### 3.3. Imunomigração Rápida

Avaliaram-se 90 amostras para a presença de antígenos de *D. immitis*, cujos resultados foram todos negativos. É de notar que em todos os testes, foi observado o aparecimento de apenas uma banda cor de rosa (Figura 18), correspondente à janela de controlo, validando os resultados dos testes.

**Figura 18** – Testes de IMR realizados em LTE de *C. lupus*, com resultados negativos.



### 3.4. Necrópsias

A dificuldade em observar sinais clínicos em vida nestes animais, faz com que a necrópsia seja um meio valioso de complemento ao diagnóstico sorológico, já que consiste na caracterização, de forma retrospectiva, das alterações patológicas e fisiológicas que ocorreram no organismo antes da morte do animal. Dos canídeos que foram examinados (Tabela 17), a grande maioria estava em bom estado de conservação ( $n=10$ ), sendo que apenas uma raposa se encontrava em más condições e um lobo em estado de conservação médio. Todas as raposas eram indivíduos adultos, com a excepção de um juvenil, enquanto que os lobos tinham idades distintas (1 juvenil (Figura

**Figura 19** – Lobo juvenil antes da necrópsia.



19), 1 subadulto e 1 adulto). Os canídeos pertenciam predominantemente ao sexo masculino, tendo sido observadas apenas 2 fêmeas *V. vulpes* e uma fêmea *C. lupus*. Em todas as necrópsias foram colhidas amostras de tecido pulmonar para congelar a -20°C e, posteriormente, processar e transformar em LTE. Também se recolheu sangue de 2 lobos e uma raposa, para a obtenção de soros, e ainda uma alíquota de exsudado da cavidade torácica de um lobo.

**Tabela 17** – Registos das necrópsias de canídeos, colheita de amostras e causas de morte.

Espécie/ Nº registo	Sexo	Idade	Estado de conservação	Colheita de amostras	Observações relevantes	Causa de morte
<b><i>C. lupus</i></b>						
08-0132	M	J	Médio	LTE	<i>Toxascaris leonina</i>	Esgana
08-0143	F	A	Bom	LTE+soro		doença infecciosa
08-0144	M	SA	Bom	LTE+soro+ exsudado		d. infecciosa/sarna sarcóptica
<b><i>V. vulpes</i></b>						
08-0113	M	J	Bom	LTE	Nemátodes na traqueia	atropelamento
08-0120	M	A	Bom	LTE	<i>Taenia</i> spp., nemátodes intestinais; alopecia bilateral da tibia e tarso	atropelamento
08-0121	M	A	Bom	LTE	<i>Toxocara canis</i> , <i>T. leonina</i>	atropelamento
08-0127	M	A	Bom	LTE+soro	<i>T. leonina</i> , <i>Taenia</i> spp., nemátodes intestinais; alopecia generalizada, caquexia, sinais de pneumonia, diarreia escura	sarna sarcóptica
08-0135	M	A	Bom	LTE		atropelamento
08-0136	F	A	Bom	LTE	<i>T. leonina</i> , <i>Spirocerca lupi</i> , <i>Taenia</i> spp.; úlceras gastro-intestinais, hipertrofia dos linfonodos mesentéricos	ND
08-0137	F	A	Bom	LTE	<i>Taenia</i> spp., nemátodes intestinais, ectoparasitismo (pulgas)	tiro (tórax)
08-0138	M	A	Mau	LTE	<i>Taenia</i> spp.	envenenamento/ traumatismo
08-0141	M	A	Bom	LTE	<i>Taenia</i> spp.	tiro (tórax)

**M**=macho; **F**=fêmea; **J**=juvenil; **SA**=subadulto; **A**=adulto; **ND**=não determinada

Observando a Tabela 17, pode constatar-se que apenas 3 animais não estavam parasitados ou não mostraram evidências disso. Os parasitas mais frequentes parecem ser os nemátodes e os céstodes, cuja presença pode tornar o hospedeiro mais vulnerável à aquisição de outras infecções, ao aparecimento de doenças por infecções latentes, ou ainda agravar o estado geral do animal quando existem infecções concomitantes.

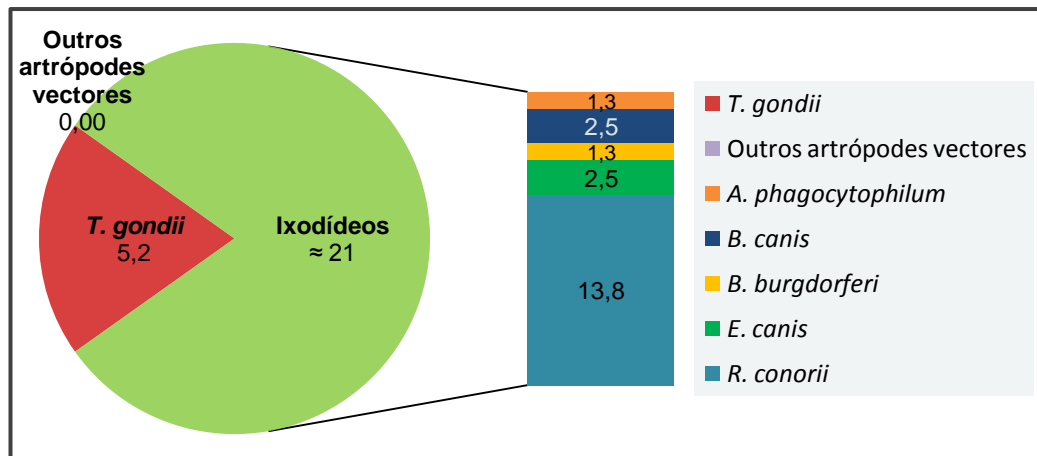
As causas de morte são variadas, ocorrendo com maior frequência o atropelamento dos animais ( $n=4$ ) e a morte por doenças infecciosas/parasitárias ( $n=4$ ). A caça com tiro foi responsável pela morte de 2 raposas, enquanto uma outra raposa foi vítima de envenenamento e/ou traumatismo, e noutra não foi possível determinar a causa de morte.

### 3.5. Análise estatística dos resultados

Depois duma breve descrição dos dados recolhidos, pode observar-se agora o Gráfico 12, que ilustra uma perspectiva geral dos resultados de seroprevalências obtidos. No que respeita aos agentes transmitidos por vectores, claramente predominaram aqueles que se transmitem por ixodídeos, em que cerca de 21% dos canídeos avaliados apresentaram anticorpos para um ou dois agentes etiológicos. Em relação aos agentes associados a outros artrópodes vectores (mosquitos, flebótomos e tabanídeos), nomeadamente *L. infantum*, *D. immitis*, *F. tularensis* e TOSV, não foram registados resultados positivos. No entanto, é de notar que algumas amostras tiveram reactividade aos anticorpos para diluições abaixo do limiar de positividade ou revelaram resultados suspeitos, que podem ser consultados no Anexo D. As amostras suspeitas de serem positivas, pela ambiguidade que apresentam, foram consideradas negativas na análise estatística aqui apresentada.

A prevalência de anticorpos anti-*R. conorii* foi a mais elevada (13,8%, IC95% 7,9-23,0%), seguida das seroprevalências de *E. canis* (2,5%, IC95% 0,7-8,7%), *B. canis* (2,5%, IC95% 0,7-8,7%), *A. phagocytophilum* e *B. burgdorferi* s.l. (ambos 1,3%, IC95% 0,2-6,8). Por outro lado, a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* revelou uma prevalência de 5,2% (IC95% 2,0-12,6%) dos canídeos com anticorpos para aquele agente patogénico.

**Gráfico 12** – Prevalências de anticorpos para agentes transmitidos por vectores e contra *T. gondii*, observadas nos canídeos analisados (valores em percentagem).



Comparando as duas populações estudadas, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os lobos e as raposas que obtiveram resultados positivos (Teste de Qui-quadrado de Pearson,  $p=0,862$ ;  $\chi^2=0,03$ ) (Tabela 18).

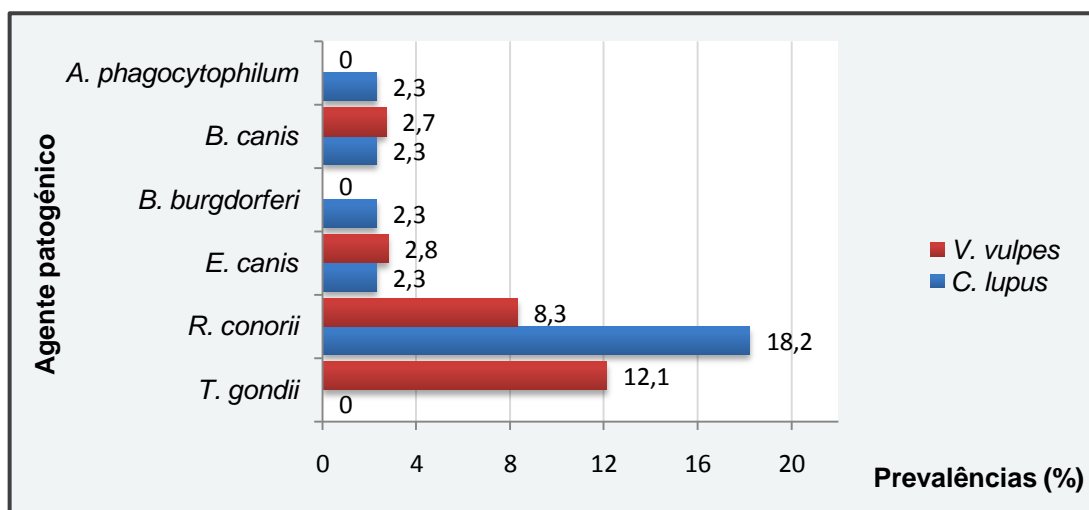
**Tabela 18** – Tabela de dupla entrada com as espécies de canídeos estudadas e a presença ou não de resultados positivos na sorologia.

Espécie	Presença de Ac/Ag		
	P	N	Total
<i>C. lupus</i>	10	34	44
<i>V. vulpes</i>	9	28	37
Total	19	62	81



O Gráfico 13 mostra a distribuição de prevalências para cada agente patogénico, de acordo com a espécie de canídeo. Nos lobos, verificou-se uma prevalência elevada de anticorpos contra *R. conorii* (18,2%, IC95% 9,5-32,0%), enquanto que nas raposas a maior prevalência de anticorpos observada foi para *T. gondii* (12,1%, IC95% 4,8-27,3%), seguida de *R. conorii* (8,3%, IC95% 2,9-21,8%).

**Gráfico 13** – Distribuição de prevalências de anticorpos para os agentes patogénicos estudados, de acordo com a espécie de canídeo.



Em relação ao tipo de amostras avaliadas (Tabela 19), particularmente entre soros e LTE, verificaram-se diferenças bastante significativas (Teste Exacto de Fisher,  $p=0,002$ ), considerando-se que a proporção de soros reactivos (47,4%) é cerca de 4 vezes superior à proporção de LTE positivos (12,9%).

**Tabela 19** – Tabela de dupla entrada com o tipo de amostras analisadas e a observação ou não de resultados positivos.

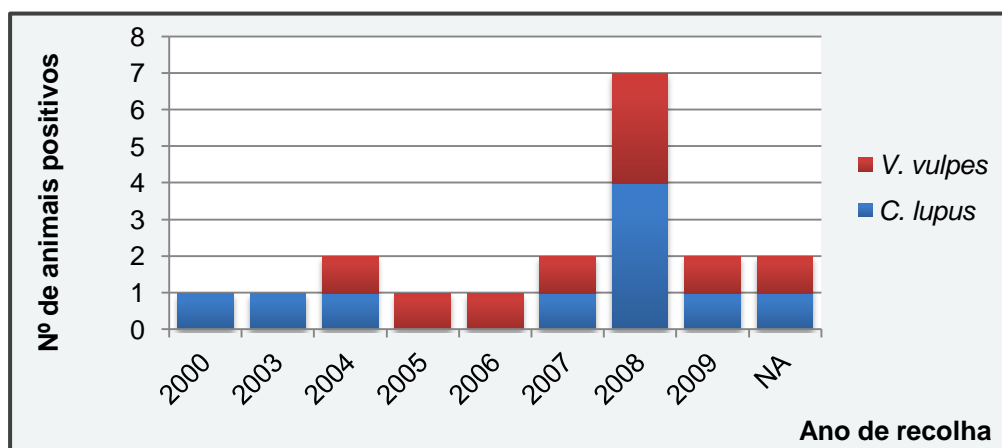
Amostra	Presença de Ac/Ag		
	P	N	Total
Soro	9	10	19
LTE	9	61	70
Total	18	71	89

Apesar de se ter colhido mais do que uma amostra em 8 canídeos, dos quais 5 animais revelaram anticorpos para alguns agentes, nenhum deles demonstrou resultados idênticos para os diferentes tipos de amostras, o que sugere que, de facto, os testes usados possam ser mais adequados para um determinado tipo de amostra, ou que os limites de positividade não são iguais para soros e LTE. Curiosamente, desses 5 canídeos, 2 lobos e 2 raposas apresentaram reactividade nos soros mas não nos LTE respectivos, enquanto o único exsudado recolhido da cavidade torácica de um lobo foi também positivo para *R. conorii*.

Atendendo ao ano de recolha das amostras (Gráfico 14), apenas se obtiveram resultados positivos em amostras recolhidas no ano de 2000, e mais tarde a partir de 2003 até ao

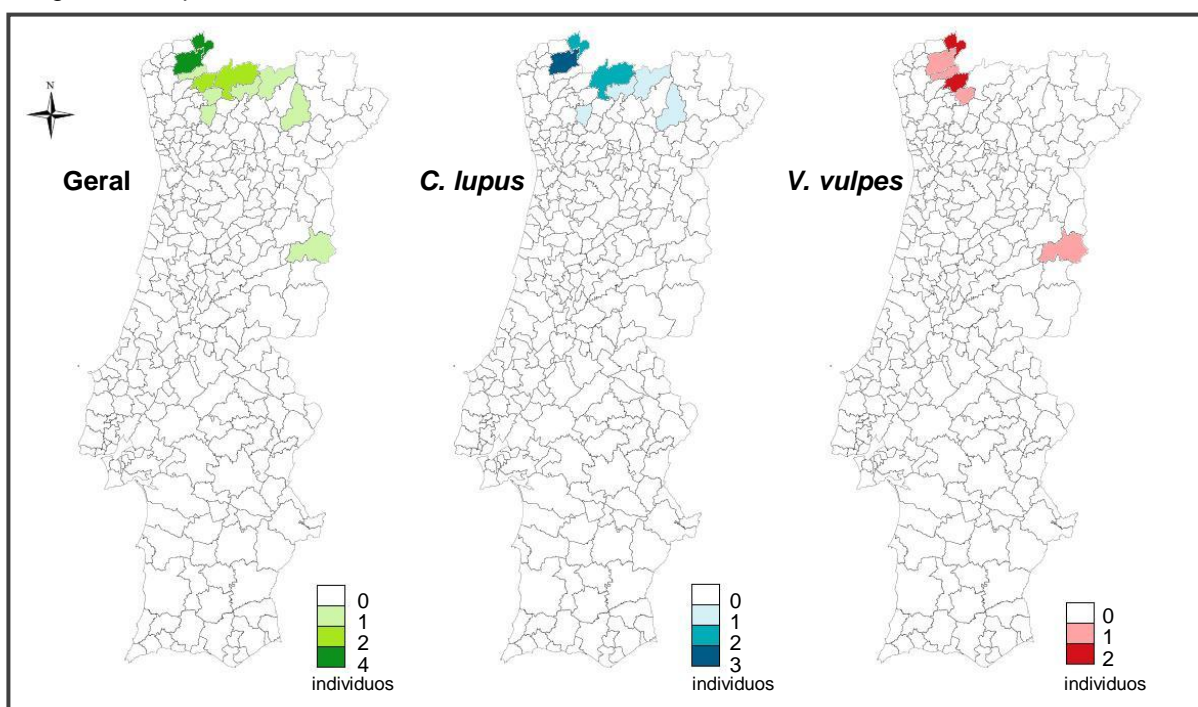
corrente ano de 2009. O ano de 2008 apresenta o maior número de amostras positivas ( $n=7$ ) para a presença de anticorpos específicos, o que pode estar relacionado com o facto de ter sido o ano em que se efectuou o maior número de colheitas ( $n=19$ ).

**Gráfico 14** – Distribuição do número de amostras positivas para a presença de anticorpos específicos, de acordo com o ano de recolha.



Observando a Figura 20, verifica-se que a distribuição dos canídeos que demonstraram títulos positivos de anticorpos concentra-se mais nos concelhos de Melgaço ( $n=4$ ) e Arcos de Valdevez ( $n=4$ ), ambos pertencentes ao distrito de Viana do Castelo, do qual foram recolhidos mais animais. O concelho com maior número de lobos positivos para os anticorpos específicos estudados corresponde a Arcos de Valdevez ( $n=3$ ), enquanto que as raposas com resultados positivos na detecção de anticorpos predominam nos concelhos de Melgaço ( $n=2$ ) e Terras de Bouro ( $n=2$ ).

**Figura 20** – Mapas com os concelhos de origem dos canídeos que revelaram anticorpos específicos, e segundo a espécie de canídeo.





No que respeita a relação entre o sexo dos canídeos e a presença ou não de anticorpos para os agentes estudados (Tabela 20), existem diferenças estatisticamente significativas (Teste de Qui-quadrado,  $p=0,003$ ;  $\chi^2=4,62$ ) entre fêmeas e machos, sendo que as primeiras apresentam maior proporção de casos positivos (36,7%) do que os machos (14,6%), com um risco 3,4 vezes superior aos machos de adquirir anticorpos por contacto com os agentes patogénicos (*Odds ratio* ou  $OR=3,4$ ).

**Tabela 20** – Tabela de dupla entrada com a relação entre o sexo dos animais e a observação ou não de resultados positivos.

Sexo	Presença de Ac/Ag		
	P	N	Total
Fêmeas	11	19	30
Machos	6	35	41
Total	17	54	71

No entanto, se analisarmos as proporções de fêmeas e machos com resultados positivos, de acordo com a espécie (Tabela 21), verificamos que na população lupina também há diferenças significativas (Teste Exacto de Fisher,  $p=0,030$ ), com maior número de fêmeas com reactividade para anticorpos (36,8%) do que machos (8,3%), enquanto que na população de raposas não parece existir relação entre o sexo e a presença de anticorpos específicos para os agentes em estudo (Teste Exacto de Fisher,  $p=0,671$ ).

**Tabela 21** – Tabela com a relação entre o sexo dos canídeos e a observação ou não de resultados positivos, de acordo com a espécie.

		Presença de Ac/Ag		
		P	N	Total
<b>C. lupus</b>	Fêmeas	7	12	19
	Machos	2	22	24
	Total	9	34	43
<b>V. vulpes</b>	Fêmeas	4	7	11
	Machos	4	13	17
	Total	8	20	28

De um modo geral, a relação entre a idade dos canídeos e a identificação de anticorpos para os agentes etiológicos abordados (Tabela 22), apresenta diferenças estatisticamente significativas (Teste Exacto de Fisher,  $p=0,034$ ), já que a obtenção de casos positivos foi consideravelmente maior nos adultos (34,1%), seguida dos juvenis (9,5%) e, em menor proporção, dos subadultos (7,7%).

**Tabela 22** – Tabela com a relação entre a idade dos animais e a observação ou não de resultados positivos.

Idade	Presença de Ac/Ag		
	P	N	Total
Juvenil	2	19	21
Subadulto	1	12	13
Adulto	15	29	44
Total	18	60	78

Quando analisamos aquelas variáveis dentro do grupo de lobos (Tabela 23), o mesmo não se verifica, encontrando-se anticorpos específicos numa proporção semelhante em todas as faixas etárias (Teste Exacto de Fisher,  $p=0,230$ ). Nas raposas, o caso muda de figura, uma vez que apenas foi encontrada reactividade para anticorpos nos adultos.

**Tabela 23** – Tabela com a relação entre a idade dos lobos e a observação ou não de resultados positivos.

<i>C. lupus</i> Idade	Presença de Ac/Ag		
	P	N	Total
Juvenil	2	14	16
Subadulto	1	7	8
Adulto	7	12	19
Total	10	33	43

Quanto ao estado de conservação das amostras analisadas, parecem haver diferenças estatisticamente significativas entre esta variável e a demonstração de resultados positivos para os anticorpos estudados (Teste Exacto de Fisher,  $p=0,010$ ) (Tabela 24). A proporção de amostras frescas com reactividade para anticorpos específicos é a maior (50,0%), seguida das amostras em bom (30,8%), médio (8,3%) e mau (4,8%) estado de conservação. De um modo geral, as amostras em melhor estado de conservação parecem estar associadas a uma maior probabilidade de se detectarem anticorpos, comparativamente às amostras que apresentam pior estado de conservação (Teste de Qui-quadrado de Pearson,  $p=0,003$ ;  $\chi^2=9,08$ ).

**Tabela 24** – Tabela com a relação entre o estado de conservação das amostras e a identificação ou não de anticorpos específicos.

Estado de conservação	Presença de Ac/Ag		
	P	N	Total
Fresco	5	5	10
Bom	12	27	39
Médio	1	11	12
Mau	1	20	21
Total	19	63	82

Em relação às necrópsias, apenas 2 lobos (08-0143 e 08-0144) e uma raposa (08-0127) revelaram anticorpos contra *R. conorii*, e no caso do lobo 08-0143 foram também identificados anticorpos anti-*B. burgdorferi* s.l.. Nestes 3 animais, tinham sido colhidas 2 ou 3 amostras diferentes, das quais apenas os soros foram reactivos. Analisando os dados obtidos durante as necrópsias, não parece existir relação entre o facto de existir infecção concomitante com outros parasitas (diferentes dos parasitas-alvo deste estudo) e a presença de anticorpos para os agentes patogénicos analisados (Teste Exacto de Fisher,  $p=0,127$ ) (Tabela 25).

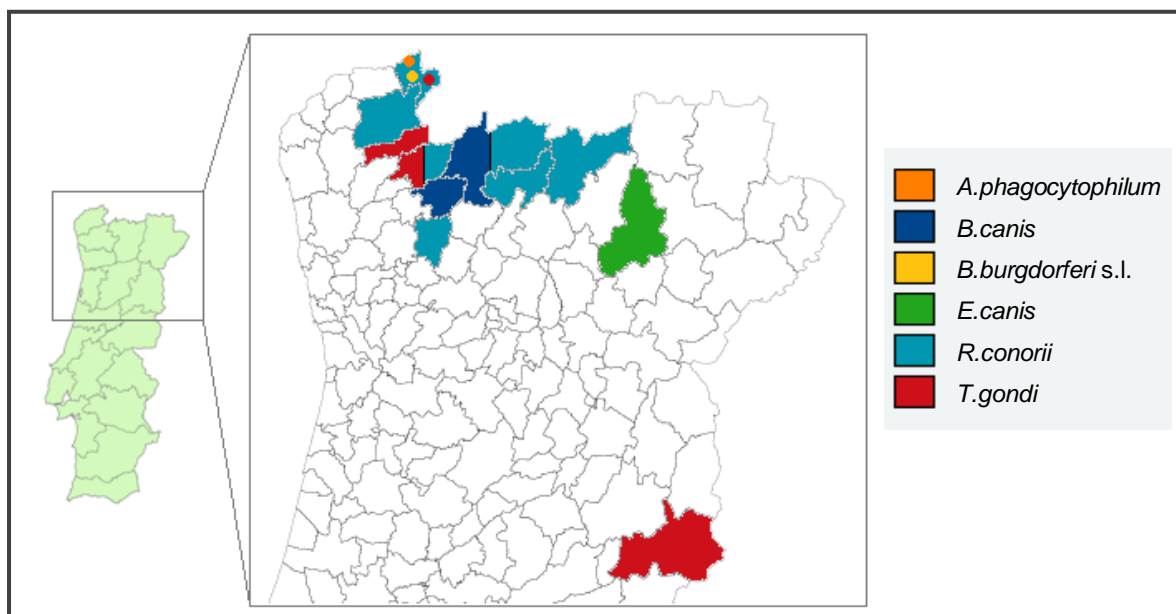
**Tabela 25** – Tabela de dupla entrada com a relação entre a presença de outros parasitas (encontrados nas necrópsias) e a observação ou não de anticorpos para os agentes em estudo.

Parasitismo concomitante	Presença de Ac/Ag		
	P	N	Total
P	1	8	9
N	2	1	3
Total	3	9	12

No total dos canídeos avaliados, a taxa de co-infecções foi de 2,5%, uma vez que somente 2 lobos demonstraram infecções concomitantes de *R. conorii* com *A. phagocytophilum* e *R. conorii* com *B. burgdorferi* s.l., respectivamente. É de salientar o facto desta evidência ter sido encontrada nos soros de duas fêmeas adultas provenientes da mesma região (Melgaço), e que, segundo a análise genética realizada numa investigação paralela com amostras destes 2 animais, as lobas em questão apresentaram uma relação genética de parentesco bastante próxima (H. Rio Maior, comunicação pessoal, Março, 2009).

Na Figura 21 pode observar-se a distribuição dos agentes patogénicos analisados, segundo o concelho de origem dos animais que revelaram anticorpos para os mesmos.

**Figura 21** – Distribuição por concelhos dos agentes patogénicos detectados no rastreio sorológico.



Atendendo agora à presença de anticorpos anti-*R. conorii*, cuja prevalência nos canídeos foi a mais elevada neste rastreio sorológico, não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre as populações de lobos e de raposas (Teste Exacto de Fisher,  $p=0,329$ ), nem em relação ao sexo (Teste Exacto de Fisher,  $p=0,084$ ) ou à idade dos animais (Teste Exacto de Fisher,  $p=0,338$ ), como pode ser observado na Tabela 26.

**Tabela 26** – Tabela com a relação entre a espécie, o sexo e a idade dos canídeos, e a observação ou não de anticorpos para *R. conorii*.

		Presença de Ac/Ag		
		P	N	Total
<b>Espécie</b>	<i>C. lupus</i>	8	36	44
	<i>V. vulpes</i>	3	33	36
	Total	11	69	80
<b>Sexo</b>	Fêmeas	7	23	30
	Machos	3	38	41
	Total	10	61	71
<b>Idade</b>	Juvenil	1	20	21
	Subadulto	1	12	13
	Adulto	8	35	43
	Total	10	67	77

Se compararmos as variáveis sexo e idade dentro de cada grupo de canídeos, os resultados são diferentes. Na população de lobos (Tabela 27), verificaram-se diferenças significativas entre fêmeas e machos (Teste Exacto de Fisher,  $p=0,033$ ), sendo que a proporção de fêmeas (31,6%) com anticorpos contra *R. conorii* foi maior do que a de machos (4,2%), o que sugere que as fêmeas têm um risco 10,6 vezes superior aos machos de adquirir anticorpos por contacto com *R. conorii* (OR=10,6). No que respeita a idade dos lobos, não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre as 3 faixas etárias (Teste Exacto de Fisher,  $p=0,313$ ). O mesmo sucedeu com a população de raposas (Tabela 28), em relação ao sexo (Teste Exacto de Fisher,  $p=0,664$ ). No entanto, neste grupo, os adultos representaram a única faixa etária com resultados positivos para *R. conorii* ( $n=3$ ).

**Tabela 27** – Relação entre o sexo e a idade dos lobos, e a observação ou não de anticorpos contra *R. conorii*.

<i>C. lupus</i>		Presença de Ac/Ag		
		P	N	Total
<b>Sexo</b>	Fêmeas	6	13	19
	Machos	1	23	24
	Total	7	36	43
<b>Idade</b>	Juvenil	1	15	16
	Subadulto	1	7	8
	Adulto	5	13	18
	Total	7	35	42

**Tabela 28** – Tabela com a relação entre o sexo das raposas, e a observação ou não de anticorpos contra *R. conorii*.

<i>V. vulpes</i>		Presença de Ac/Ag		
<b>Sexo</b>		P	N	Total
Fêmeas		1	10	11
Machos		2	15	17
Total		3	25	28

#### 4. Discussão

Recordando os objectivos desta dissertação, pretendeu-se realizar um rastreio sorológico de diferentes agentes patogénicos para os cánidos, de modo a estimar prevalências desses organismos nas populações de lobos e raposas do norte de Portugal. Para o efeito, recolheram-se 90 amostras de cánidos silvestres com origem em 7 distritos distintos, durante um período de tempo que abrangeu 13 anos, desde 1995 a 2009. Os agentes avaliados incluíam bactérias, nomeadamente *A. phagocytophilum*, *B. burgdorferi* s.l., *E. canis*, *R. conorii* e *F. tularensis*, protozoários, como *B. canis*, *L. infantum* e *T. gondii*, flebovírus, como o vírus Toscana, e também nemátodes, como *D. immitis*. Exceptuando *T. gondii*, todos os agentes são transmitidos por artrópodes vectores, pelo que será interessante inferir sobre o tipo de vectores mais implicados na transmissão de doenças naquela região do país, de acordo com a interpretação dos resultados obtidos. Por outro lado, tentou estabelecer-se eventuais relações entre as prevalências estimadas e variáveis como a espécie de hospedeiro, o sexo, a idade e a sua origem geográfica, bem como o tipo de amostras analisadas e o seu estado de conservação.

De um modo geral, pode dizer-se que os objectivos fundamentais deste trabalho foram cumpridos, ainda que permaneçam algumas dúvidas sobre a realidade das prevalências existentes nas espécies estudadas, e também acerca do panorama actual na região em estudo, uma vez que algumas amostras já foram colhidas há bastante tempo e podem representar gerações de indivíduos diferentes ou que já não existem.

No total, foram analisados 81 cánidos, dos quais 44 lobos e 37 raposas. Dessa amostra, apenas 19 animais (aproximadamente 23,5%) revelaram anticorpos específicos para alguns dos agentes patogénicos avaliados, nomeadamente 10 lobos e 9 raposas (Tabela 29).

**Tabela 29** - Tabela com os agentes etiológicos detectados no rastreio sorológico realizado nos cánidos silvestres. **Legenda:** + positivo; - negativo; ? suspeito.

	<i>C. lupus</i>	<i>V. vulpes</i>
<i>A. phagocytophilum</i>	+	-
<i>B. burgdorferi</i> s.l.	+	?
<i>B. canis</i>	+	+
<i>D. immitis</i>	-	-
<i>E. canis</i>	+	+
<i>F. tularensis</i>	?	-
<i>L. infantum</i>	-	-
<i>R. conorii</i>	+	+
<i>T. gondii</i>	-	+
Vírus Toscana	?	?

Numa apreciação global, as prevalências observadas foram de 1,3% para *A. phagocytophilum* e *B. burgdorferi* s.l. (respectivamente), 2,5% para *B. canis*, 2,5% para *E. canis*, 13,8% para *R. conorii* e 5,2% para *T. gondii*. Os agentes *D. immitis*, *F. tularensis*, *L. infantum* e o vírus Toscana não foram identificados para o limiar de positividade em nenhuma amostra. A taxa de co-infecções foi de 2,5%, uma vez que somente 2 lobos demonstraram infecções concomitantes de *R. conorii* com *A. phagocytophilum* e *R. conorii* com *B. burgdorferi* s.l..

Comparando as duas populações de canídeos, não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre elas, o que pode sugerir que nenhuma das espécies de canídeos apresenta, à partida, maior ou menor susceptibilidade aos agentes etiológicos em questão. No entanto, quando se analisaram as prevalências dentro de cada grupo, tornaram-se evidentes algumas diferenças, como o facto de se terem detectado anticorpos anti-*T. gondii* somente em raposas (12,1% do grupo de raposas), e dos anticorpos contra *R. conorii* terem sido identificados numa proporção de lobos (18,2%) maior do que a de raposas (8,3%). Os anticorpos para *A. phagocytophilum* e *B. burgdorferi* s.l. também foram detectados apenas em lobos, neste caso, correspondendo a 2 indivíduos diferentes que apresentaram cada um co-infecção com *R. conorii*. Todavia, foram encontradas algumas semelhanças entre as duas espécies de canídeos, no que respeita a *B. canis* e *E. canis*, para os quais se detectaram títulos de anticorpos semelhantes em ambos os grupos (2,7% e 2,3% para *B. canis*, e 2,8% e 2,3% para *E. canis*, em raposas e lobos, respectivamente). Em geral, a bibliografia consultada apresenta valores de prevalências superiores àqueles que se determinaram neste estudo.

Assim, no caso de *A. phagocytophilum*, há referência de prevalências de 54,5% em cães domésticos, em Portugal (Santos et al., 2009), e em canídeos silvestres nos EUA os valores são semelhantes: 52% em raposas cinzentas e 46% em coiotes (Gabriel, 2006). Apesar destes canídeos não pertencerem ao mesmo género do lobo ibérico (excepto o coiote, *Canis latrans*), a prevalência de anticorpos anti-*A. phagocytophilum* de 2,3%, obtida no grupo dos lobos, está bastante longe de atingir os valores observados nos outros estudos. Valores mais próximos, como 1,8%, foram registados em gatos, no nordeste de Espanha (Solano-Gallego et al., 2006). A prevalência de anaplasmoose granulocítica canina tende a aumentar com a idade dos animais e é mais frequente no sexo feminino (Figueiredo, 2007), dados que coincidem com as características da única fêmea adulta de lobo que revelou anticorpos para a bactéria.

Em relação a *B. burgdorferi* s.l., a prevalência de 2,3% obtida, também num único lobo, aproxima-se bastante de outros valores relatados em estudos efectuados em Portugal, que indicam 2,25% (Alexandre, 2006) a 9% (Hovius, 2005) em cães domésticos. Em humanos, foi identificada uma taxa de 12,5% em trabalhadores do PNPG, embora não tenham sido encontrados ixodídeos positivos para *B. burgdorferi* nesse parque (Amaro, 2005). Também em Espanha, foram descritas prevalências de 0,6-11,6% em canídeos (Figueiredo, 2007).

O agente etiológico da erliquiose monocítica canina, *E. canis*, tem sido documentado como uma bactéria com elevado tropismo para canídeos silvestres, entre eles raposas, lobos, coiotes e chacais (Fishman et al., 2004, Figueiredo, 2007). No corrente estudo, estimaram-se prevalências de 2,8% nas raposas e 2,3% nos lobos, que ficam muito aquém dos valores referenciados por outros autores, nomeadamente em raposas (36%) e chacais (36%) da região de Israel. Em Portugal, as prevalências em cães domésticos das zonas de Lisboa

(Ferreira, 2008) e Setúbal (Bacellar et al., 1995), também são bastante mais altas, cerca de 41,7% e 50%, respectivamente.

No que respeita a prevalência de anticorpos para *R. conorii*, a população de lobos demonstrou valores mais elevados (18,2%) do que a de raposas (8,3%). Comparando estes resultados com a bibliografia, verificou-se que, mais uma vez, as prevalências obtidas foram inferiores às documentadas para canídeos domésticos em Portugal, designadamente 38,5% no Algarve (Alexandre, 2006), 85,6% em Setúbal (Bacellar et al., 1995), 73% (Duarte, 2008) e 88,5% (Ferreira, 2008) da área de Lisboa. Apesar de Bragança constituir o distrito com maior número de casos de febre botonosa em humanos (Sousa et al., 2003), não foram registados casos positivos em canídeos com origem nessa região, mas sim nos distritos de Braga ( $n=2$ ), Viana do Castelo ( $n=7$ ) e Vila Real ( $n=3$ ). Por outro lado, em termos de factores de risco associados à febre botonosa, sabe-se que as fêmeas são mais susceptíveis (Figueiredo, 2007), assim como os indivíduos adultos (mais de 2 anos de idade) (Alexandre, 2006). No corrente estudo, e analisando o conjunto total dos canídeos, não foi encontrada nenhuma relação com a espécie, o sexo ou a idade. Pelo contrário, quando se analisou cada população separadamente, verificou-se que nos lobos houve, de facto, diferenças estatisticamente significativas entre fêmeas e machos, confirmando o que está descrito na bibliografia, de que o sexo feminino apresenta maior risco de infecção por *R. conorii*, neste caso, cerca de 10 vezes mais do que o sexo masculino. Em relação às raposas, é de realçar que apenas animais adultos ( $n=3$ ) demonstraram anticorpos para o limiar de positividade estabelecido, de acordo com o que as referências bibliográficas documentam.

No que refere a *B. canis*, segundo alguns autores (Irwin, 2005, Figueiredo, 2007), nas zonas endémicas da bacia Mediterrânica as prevalências podem variar entre 4% a 80% nos cães domésticos e, em Portugal, foi registado um valor de 58,3% em cães da região de Lisboa (Ferreira, 2008). Neste trabalho, obtiveram-se prevalências de 2,7% nas raposas e 2,3% nos lobos, novamente abaixo das taxas referenciadas na bibliografia. No entanto, os dois canídeos (uma raposa e um lobo), nos quais foram identificados anticorpos anti-*B. canis*, eram adultos do sexo masculino, o que, por um lado, está de acordo com o facto dos machos terem maior predisposição para a doença, mas por outro, contraria a tendência de maior susceptibilidade nos animais jovens (Irwin, 2005, Figueiredo, 2007).

*T. gondii* já foi identificado em inúmeras espécies de mamíferos, variando muito em termos de seroprevalências. No presente estudo, apenas se detectaram anticorpos para este protozoário nas raposas ( $n=4$ ), com uma prevalência de 12,1% nesta espécie. Comparando com outros dados documentados, este valor é ligeiramente inferior aos encontrados em raposas (31%, na Europa) (Meireles et al., 2004), cães domésticos (23%, na Suécia) (Lopes, Cardoso & Rodrigues, 2008) e mesmo em gatos (35,8%) (Meireles et al., 2004) e suínos (15,6%) (Sousa et al., 2005) com origem em Portugal. Nos canídeos, os animais jovens são geralmente mais susceptíveis à toxoplasmose (Rochette, 2003), no entanto, tal não se

verificou nas raposas positivas para os anticorpos específicos, uma vez que pelo menos 3 eram fêmeas adultas e numa desconhecia-se a idade e o sexo. Estes dados podem, por outro lado, sugerir uma predisposição das fêmeas para a doença, mas tais suposições devem ser feitas com cautela, pois a amostra pode não ser suficientemente representativa da população de raposas da região estudada. Por outro lado, o facto de só as raposas terem demonstrado contacto com o agente, pode resultar da alimentação generalista e oportunista destes canídeos.

Em relação aos restantes agentes patogénicos pesquisados, nomeadamente *F. tularensis*, *D. immitis*, *L. infantum* e vírus Toscana, não se detectaram anticorpos nem antigénios (no caso de *D. immitis*) para os limites de positividade dos testes aplicados. Estes resultados são particularmente interessantes no caso de *L. infantum* e de *D. immitis*, uma vez que estes agentes estão descritos em várias regiões de Portugal, com prevalências que variam entre 3,9-21,3% (OnLeish, 2009) para *L. infantum* e 9-51,2% (Meireles, n.d.) para *D. immitis*. Particularmente a leishmaniose, já foi registada nos distritos de Vila Real (concelhos de Alijó, Mesão Frio, Penaguião e Peso da Régua) e Viseu (concelho de Tabuaço) (OnLeish, 2009), que coincidem com algumas das zonas abrangidas pelo corrente estudo, pelo que seria de esperar que os parasitas circulassem naquelas regiões. Quanto a *F. tularensis* e ao vírus Toscana, as suas prevalências não são bem conhecidas em Portugal, embora haja registos de 8,9% para *F. tularensis* (Lopes de Carvalho et al., 2009) e 1-1,6% para o flebovírus (Amaro et al., 2007, Charrel et al., 2005), em humanos. Contudo, nos canídeos silvestres desconhecem-se as seroprevalências destes agentes, até porque no caso da tularémia, os principais reservatórios da bactéria parecem ser roedores e lagomorfos, enquanto que para o vírus Toscana, ainda não se conhecem os verdadeiros hospedeiros reservatórios.

A análise detalhada dos dados recolhidos permitiu verificar que, apesar dos canídeos apresentarem origens geográficas (Figura 14) com maior tendência para o nordeste do país, no caso dos lobos, e para o noroeste, no caso das raposas, quando se avaliou a origem dos animais que apresentaram resultados positivos notou-se uma concentração maior nas zonas fronteiriças com Espanha (Figura 20), principalmente nos concelhos de Arcos de Valdevez ( $n=4$ ) e Melgaço ( $n=4$ ). De facto, o concelho de Arcos de Valdevez foi aquele onde se observou um maior número de lobos positivos ( $n=3$ ), enquanto que na população de raposas foram os concelhos de Melgaço ( $n=2$ ) e Terras de Bouro ( $n=2$ ). Se tivermos em conta os tipos de *habitats* preferenciais destes canídeos, reparamos que as distribuições geográficas observadas não fogem à normalidade. As raposas são carnívoros generalistas e, devido à sua capacidade de adaptação, ocupam uma diversidade de *habitats* quase ilimitada, desde as zonas costeiras até às zonas montanhosas do norte e centro do país. Podem preferir regiões de matagal, floresta ou campos agrícolas, mas sobretudo escolhem territórios onde o alimento seja abundante, razão pela qual também são encontradas em



zonas suburbanas. No que respeita aos lobos, a sua distribuição não é homogênea, localizando-se mais no interior norte e centro do país. Pimenta et al. (2005) referem que provavelmente essa distribuição das alcateias surge como reflexo do elevado grau de humanização da paisagem, na qual a disponibilidade de vegetação para locais de refúgio é um factor limitante, bem como a disponibilidade de alimento que acaba por ser bastante estável ao longo tempo, uma vez que é assegurada em grande parte por fontes antropogénicas (principalmente ruminantes domésticos). Os mesmos autores acrescentam que, a norte do rio Douro, as áreas de maior densidade de lobos correspondem às zonas de fronteira com Espanha no PNPG e no limite norte do concelho de Bragança (Pimenta et al., 2005), como se pode verificar no mapa do Anexo I. Estes dados são concordantes com as evidências obtidas no presente estudo, particularmente na população lupina, o que significa que, embora a amostra recolhida possa não ser suficientemente representativa, abrangeu de um modo geral as várias áreas de distribuição dos lobos no território português, acima do rio Douro. Pode inclusivamente, dizer-se que os lobos analisados pertencem muito provavelmente aos núcleos populacionais da Peneda/Gerês, do Alvão/Padrela e de Bragança.

No que refere o sexo dos canídeos, para ambas as espécies, os machos predominaram em comparação com as fêmeas, representando cerca de 55% (24/44) dos lobos e 46% (17/37) das raposas. Estes números não são surpreendentes, se considerarmos que os dois sexos têm comportamentos distintos, na medida em que os machos percorrem mais quilómetros para marcar o seu território e tendem a dispersar mais do que as fêmeas, o que os pode colocar em situações de maior risco e justificar, em parte, a maior mortalidade neste sexo. Curiosamente, e ao contrário do que se poderia esperar pelo comportamento típico dos canídeos, as fêmeas apresentaram maior número de casos positivos para a presença de anticorpos específicos, no conjunto total. De forma semelhante, as fêmeas de lobo revelaram diferenças estatisticamente significativas em relação aos machos (36,8% vs. 8,3%). Na população de raposas, contudo, não se observou o mesmo, e não foi estabelecida uma relação entre o sexo e a presença de anticorpos para o limiar de positividade.

Outro aspecto que foi tido em conta foi a idade dos canídeos, dividida em 3 classes: juvenil, subadulto e adulto. Embora esta classificação possa ter sido um pouco subjectiva, uma vez que os animais subadultos nem sempre são facilmente distinguidos dos adultos jovens, considerou-se que 46,9% (38/81) dos carnívoros eram adultos, 24,7% (20/81) eram juvenis e 13,6% (11/81) correspondiam a subadultos. Pela análise realizada entre o número de indivíduos de cada faixa etária e os animais que apresentaram resultados positivos na sorologia, constatou-se que proporção de adultos (34,1%) também aqui foi superior à dos juvenis (9,5%) e dos subadultos (7,7%). Pelo contrário, a mesma avaliação aplicada à população de lobos não demonstrou diferenças significativas entre as 3 classes etárias. Por

outro lado, na população de raposas, foi interessante reparar que apenas animais adultos revelaram reactividade aos anticorpos estudados.

Duma maneira geral, os dados registados estão de acordo com os diversos autores no que respeita o sexo e a idade dos canídeos com maior susceptibilidade aos agentes patogénicos avaliados, designadamente, o facto das fêmeas e dos adultos constituírem os grupos mais afectados. Apenas em duas situações não se observou essa tendência, como já foi referido antes, no caso de *B. canis*, em que geralmente os machos jovens são mais vulneráveis ao protozoário (foram positivos 2 machos adultos), e também no caso de *T. gondii*, em que a infecção é mais comum nos canídeos jovens (foram positivos 3 adultos).

Tendo em conta as limitações da recolha não sistemática dos canídeos mortos, que detecta principalmente a mortalidade de origem antropogénica (atropelamento, tiro, laço), não será correcto inferir que a razão entre os sexos dos animais recolhidos seja representativa da que existe, efectivamente, nas populações de lobos e raposas em Portugal. Assim como não se pode extrapolar a estrutura etária dessas populações a partir da amostra recolhida. De referir, contudo, que ainda que os animais mais jovens sejam os mais inexperientes e menos habituados à presença humana, para além de terem maior tendência para a dispersão e, por isso, estarão sujeitos a zonas mais humanizadas e/ou mais perigosas, a classe etária que revelou maior mortalidade foi a dos adultos, contrariamente ao que seria de esperar pelo comportamento dos animais. As razões para este facto não foram estabelecidas, mas poderão estar relacionadas com o facto das proporções de adultos, subadultos e juvenis encontrados mortos não corresponderem, de facto, à realidade existente nas populações destes canídeos e que, apenas por terem sido encontrados mais adultos, se atribua uma mortalidade superior a este grupo.

As amostras recolhidas incluíram 19 soros, 70 LTE e um exsudado da cavidade torácica de um lobo, dos quais 9 soros (47,4%) e 9 LTE (12,9%) foram positivos para a presença de anticorpos específicos. Esta diferença estatisticamente significativa entre os dois tipos de amostras demonstrou que a proporção de soros positivos foi cerca de 4 vezes superior à de LTE positivos. Adicionalmente, em 5 de 8 animais, aos quais foi retirado mais do que um tipo de amostra, foram identificados anticorpos para o limiar de positividade em 4 soros e no único exsudado existente, não tendo sido detectados títulos positivos de anticorpos nos LTE respectivos. Estas evidências podem sugerir uma melhor adequação dos testes sorológicos a um determinado tipo de amostra, neste caso, soro sanguíneo, mas também podem significar que os limites de positividade não são idênticos para os diversos tipos de amostras (ou até podem estar patentes as duas hipóteses). De facto, segundo a bibliografia consultada, existe uma variedade de testes sorológicos que podem ser usados para detectar anticorpos IgG em amostras com origem em diferentes tecidos, nomeadamente a IFI, ELISA aglutinação em placa e AD, entre outros. Para a maioria dos agentes em questão, a IFI é uma técnica com boa sensibilidade, apesar de estar associada a falsos positivos, pela

reação cruzada que pode ocorrer com outros agentes com características morfológicas e imunológicas semelhantes, ou a falsos negativos, quando os níveis de anticorpos são relativamente baixos.

No caso de *A. phagocytophilum*, apesar desta técnica ser muito sensível, os falsos negativos tendem a surgir mais na fase inicial da infecção, pelo reduzido número de anticorpos, assim como pode ocorrer reactividade cruzada com outras espécies do género *Anaplasma* e de *Ehrlichia* spp.. Apenas num soro de lobo foram detectados anticorpos para *A. phagocytophilum*, com um título final de 128, apesar do soro de outro lobo ter revelado títulos de anticorpos na diluição de 1:32, e suspeitas na diluição de 1:64 que acabou por ser confirmada como negativa na diluição de 1:128.

Em relação a *B. burgdorferi* s.l., a IFI demonstrou um título de anticorpos de 64 num soro de lobo, mas foram também detectados anticorpos na diluição de 1:32 em 2 lobos e 6 raposas. Entre esses canídeos, 4 amostras revelaram resultados suspeitos na diluição de 1:64 e os restantes foram negativos. Para além destes, 17 amostras de lobos e 9 de raposas apresentaram reacções suspeitas na diluição de 1:32, que acabaram por não ser confirmadas na diluição seguinte, por uma questão de economia de lâminas. De referir que, não obstante o facto de no conjunto final apenas um animal ter demonstrado títulos positivos para *B. burgdorferi* s.l., os resultados da IFI para este agente gerou uma quantidade considerável de reacções suspeitas, o que deixa algumas dúvidas em relação aos resultados obtidos, nomeadamente, no que respeita o limiar de positividade para os canídeos silvestres avaliados, que poderá ser inferior ao *cut-off* estipulado (1:64).

A IFI foi igualmente aplicada para detectar anticorpos contra *E. canis*, cujos resultados foram positivos para 2 LTE, um de cada espécie, apresentando ambas as amostras títulos finais de 128, acima do *cut-off* estabelecido (1:64). Não se pode esquecer, contudo, que nas regiões endémicas, como Portugal, a ocorrência de reactividade cruzada com *E. ewingii*, *E. chaffeensis* ou *A. phagocytophilum*, por exemplo, pode produzir falsos positivos.

Na análise da presença de anticorpos contra *R. conorii*, obtiveram-se 6 amostras positivas para o limiar estabelecido, 1:128, e ainda 5 amostras com títulos finais de 256. De notar que 8 amostras adicionais tinham títulos de anticorpos para a diluição de 1:32, mas 3 foram negativas na diluição consecutiva e 5 não puderam ser analisadas, pois esgotaram-se. Apesar de *R. conorii* ter sido o agente patogénico mais prevalente neste estudo, alguns resultados podem representar falsos positivos, por reação cruzada com outras espécies do género *Rickettsia* ou da família Rickettsiaceae.

*B. canis* foi detectada por IFI em 2 LTE, com títulos finais de 160 numa raposa e de 320 num lobo. Abaixo do limiar de positividade (1:80), foram detectadas 8 amostras na diluição de 1:20, das quais todas demonstraram anticorpos na diluição de 1:40. Curiosamente, 2 amostras pertencentes ao mesmo lobo (um soro e um LTE) revelaram anticorpos até à diluição de 1:40, constituindo o único animal onde se observaram resultados idênticos para

diferentes tipos de amostras, para o mesmo agente etiológico. A IFI é uma técnica muito sensível para a identificação de anticorpos anti-*B. canis*, todavia, não evita a possibilidade de haver reactividade cruzada com *Babesia* spp., *Neospora* spp. e *Toxoplasma* spp..

Em relação a *T. gondii*, a IFI é amplamente usada, embora a aglutinação directa seja altamente sensível, para além de ter a vantagem de não ser específica para a espécie, o que teria sido mais adequado a este estudo, uma vez que o teste de IFI usado aplica-se particularmente a amostras de cães domésticos. Neste estudo, resultaram 4 amostras positivas (2 soros e 2 LTE) para o limiar de 1:80, todas com origem em raposas. As reacções cruzadas com anticorpos anti-nucleares e com o factor reumatóide podem originar falsos positivos.

No que respeita *L. infantum*, não se detectaram anticorpos para o limiar de positividade (1:80), contudo, na diluição de 1:40 verificou-se a presença de anticorpos em 6 LTE (4 lobos e 2 raposas). A sensibilidade da IFI é menor nos primeiros meses de infecção, mas tende a aumentar bastante com a progressão da doença, pelo que a ausência de resultados positivos para o *cut-off* estabelecido pode ser devida, em parte, ao facto do teste não detectar níveis baixos de anticorpos.

A IFI para o vírus Toscana também não revelou anticorpos para o limite de positividade de 1:32. Mas consideraram-se 2 soros suspeitos para a diluição de 1:16, cuja ambiguidade não ficou esclarecida na diluição de 1:32, sendo que um dos soros, pertencente a uma raposa, foi particularmente suspeito nessa diluição. O rastreio do TOSV nas populações de lobos e raposas teve como objectivo a tentativa de encontrar um potencial hospedeiro reservatório para o vírus, uma vez que se desconhece por completo o seu verdadeiro reservatório. O comportamento destes canídeos, principalmente das raposas, que habitam tocas com condições favoráveis ao estabelecimento de flebótomos vectores do vírus, poderia indicar estes carnívoros como potenciais reservatórios do mesmo. No entanto, os resultados obtidos não foram muito promissores, ainda que seja curioso verificar que a amostra que levantou mais suspeitas pertence, de facto, a uma raposa, pelo que seria interessante confirmar essas suspeitas com outras técnicas mais precisas, como os métodos moleculares.

Os testes de aglutinação são bastante fáceis de executar, requerendo pouco equipamento especializado. Contudo, na detecção de anticorpos contra *F. tularensis*, a aglutinação pode originar falsos negativos na primeira semana de infecção, em que os títulos de anticorpos são baixos, começando a subir com a evolução da doença e atingindo um pico após 4 a 5 semanas. Também nesta técnica podem surgir falsos positivos por reacções cruzadas com antígenos de outras bactérias (*Brucella* spp., *Proteus* OX19 e *Yersinia* spp.), mas que poderiam ser minimizados pelo tratamento dos soros com DDT (Lopes de Carvalho et al., 2009), procedimento que não foi efectuado no corrente estudo. A falta de valores padrão dos limiares de positividade para canídeos, pode, em certa medida, explicar a ausência de

resultados positivos para *F. tularensis*. Embora esses valores variem de laboratório para laboratório, um estudo (Zarnke et al., 2004) determinou um *cut-off* de 1:20 na aglutinação em placa em lobos. No presente estudo, uma vez que não se conhecem os limites de positividade para lobos e raposas, as amostras foram testadas a partir da diluição de 1:20, apesar de ter sido considerado um *cut-off* de 1:80. Mesmo assim, não se obtiveram resultados positivos, ainda que 2 lobos tenham tido reacções suspeitas de serem positivas. De referir que 26 amostras não puderam ser analisadas, pelo facto de se terem esgotado.

Por outro lado, a IMR constitui um teste bastante rápido e simples, com uma aplicação muito versátil, na medida em que detecta a presença de antígenos, ao contrário das outras técnicas sorológicas, pelo que pode ser utilizada em diferentes espécies, para além de detectar infecções ocultas (amicrofilaremia). Apesar da IMR ser um teste bastante sensível e específico, sem reactividade cruzada para outros parasitas (Genchi et al., 2001), no presente estudo, a ausência de resultados positivos para *D. immitis* foi notória. Uma justificação para isto podem ser os baixos níveis de antígenos circulantes, que poderão ter originado falsos negativos. De facto, a sensibilidade desta técnica pode ser francamente reduzida em canídeos com baixas cargas parasitárias, razão pela qual se recomenda a aplicação do teste cerca de 5 meses após a infecção (para evitar o período pré-patente da doença). Os falsos negativos também podem surgir devido à presença de fêmeas imaturas ou em infecções causadas apenas por machos. Neste caso, não se considera a administração de adulticidas nos canídeos silvestres como causa de falsos negativos, por razões óbvias.

Não obstante os métodos sorológicos usados, importa referir que a maioria deles têm aplicação em amostras de soro sanguíneo, plasma ou sangue inteiro (com a excepção do TOSV que, por ter maior tropismo para o sistema nervoso, deveria ser testado no LCR), pelo que a sua utilização em LTE pode ser questionável. De facto, os limiares de positividade para cada agente são, geralmente, determinados para amostras como o soro sanguíneo, pelo que não se conhecem de todo os limites adequados aos LTE. No presente estudo, realizou-se uma abordagem com base no pressuposto de que os LTE poderiam apresentar limiares mais baixos que os soros. Deste modo, começou por se testar as amostras em diluições mais baixas que os *cut-off* normalmente aceites, de maneira a evitar diluições demasiado elevadas, que não abrangessem eventuais títulos de anticorpos baixos nos LTE. Ferroglio, Rossi & Gennero (2000), aplicaram a técnica de fixação do complemento em amostras de soro e LTE para comprovar a aptidão dos últimos na monitorização da brucelose em ruminantes, e os resultados indicaram que os títulos de anticorpos obtidos nos LTE eram uma a três vezes mais baixos que os títulos observados nos soros. Os autores acrescentaram ainda que havia uma boa concordância dos resultados positivos entre soros e LTE, referindo este tipo de amostra como um meio adequado para a monitorização da doença naqueles animais. Outros estudos têm comparado a utilização de LTE em

substituição do soro para diversas doenças e em diferentes espécies de animais, com resultados variáveis. Foram determinadas sensibilidades de 22% numa pesquisa de tularémia efectuada em castores (*Castor fiber*) (Mörner, Sandström & Mattsson, 1988), contrastando com uma sensibilidade de 100% no estudo de brucelose em ruminantes referido anteriormente (Ferroglio et al., 2000). Também em termos de especificidade, já foram registados valores bastante aceitáveis (Mörner et al., 1988; Ferroglio et al., 2000; Garin-Bastuji, Cau, Boué, Terrier & Hars, 2004; Toma et al., 2004).

No corrente trabalho, tanto os soros, como os LTE e o exsudado demonstraram títulos de anticorpos positivos para os vários agentes pesquisados, o que revela, à partida, que são amostras com potencial para a monitorização de algumas doenças. Contudo, a proporção de soros positivos foi superior à de LTE, e não houve concordância entre os resultados observados nos dois tipos de amostras, nos animais em que se colheram 2 ou 3 amostras diferentes. No entanto, estas evidências podem resultar do facto da maior parte dos LTE terem origem em anos menos recentes, tendo sofrido alguma degradação ao longo do tempo, e pelo facto de aproximadamente 36% das amostras apresentarem pior estado de conservação, que pode influenciar a viabilidade das amostras e, por consequência, os resultados obtidos. De facto, quando se analisou a relação entre o estado de conservação das amostras e a obtenção de resultados positivos, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas, na medida em que 50,0% das amostras positivas inseriam-se no estado “fresco” e 30,8% na categoria “bom”, enquanto que apenas 8,3% e 4,8% apresentavam “médio” e “mau” estados de conservação, respectivamente. Estes dados reforçam a ideia de que amostras de pior qualidade, em termos de conservação, podem condicionar a detecção de anticorpos nas mesmas e influenciar os resultados obtidos na sorologia.

Em geral, os testes sorológicos utilizados foram bastante práticos e eficazes na detecção de títulos de anticorpos específicos, contudo, é importante salientar algumas limitações destas técnicas, nomeadamente a possibilidade de ocorrência de reacções cruzadas com uma série de agentes que não os agentes-alvo deste estudo. Adicionalmente, nos testes de IFI, a subjectividade da leitura e interpretação do grau de fluorescência observada, podem influenciar os resultados e as respectivas conclusões daí extrapoladas. Particularmente nas lâminas de IFI de *B. canis*, houve alguma dificuldade em distinguir resultados fraco-positivos/positivos de resultados negativos, pela fluorescência pouco homogénea observada nessas amostras. Para além disso, usaram-se conjugados específicos para canídeos domésticos, cuja especificidade em espécies de canídeos silvestres pode ser questionável (Hietala & Gardner, 1999). Esta questão é principalmente importante nas amostras de raposas, uma vez que esta espécie pertence a um género diferente (*Vulpes* spp.) dos lobos e dos cães domésticos (*Canis* spp.). Na aglutinação em placa, a maior limitação consistiu na quantidade de amostra necessária, o que fez com que um número considerável de amostras

não fosse analisado para a presença de anticorpos anti-*F. tularensis*. Por outro lado, a presença de sedimento em vários LTE, dificultou a observação da própria aglutinação nas placas, efeito que poderia ter sido evitado, ou pelo menos minimizado, através da centrifugação das amostras. O teste de IMR para detectar antígenos de *D. immitis* foi o método mais simples de executar e também o mais fácil de interpretar, já que a leitura das bandas de cor foi bastante esclarecedora.

Adicionalmente à sorologia, foram efectuadas 12 necrópsias, de 3 lobos e 9 raposas. Nestes animais, não se descobriram alterações patológicas que sugerissem infecção por qualquer um dos agentes etiológicos avaliados. Aliás, na maioria dos casos, foi determinada a causa de morte, sendo que 4 raposas foram vítimas de atropelamento, 2 raposas sofreram traumatismos provocados por tiro, noutra suspeitou-se de envenenamento, enquanto que nos restantes animais as causas de morte foram atribuídas a doenças infecciosas/parasitárias (Esgana, sarna sarcóptica e outras), e em apenas uma raposa não se determinou a causa de morte. Uma vez que em 9 canídeos foi confirmada a presença de parasitas gastro-intestinais, do aparelho respiratório e/ou ectoparasitas, analisou-se a relação entre a presença desses parasitas e a detecção de anticorpos para os agentes-alvo deste estudo, não tendo sido encontrada uma associação entre as duas variáveis. De referir que, das doenças avaliadas, a patofisiologia respectiva que se conhece até ao momento foi estudada em canídeos domésticos, humanos ou modelos de laboratório, pelo que não se sabe ao certo em que medida essas observações podem ser extrapoladas para canídeos silvestres. Por outro lado, o facto das alterações patológicas não serem patognomónicas para aquelas doenças dificulta ainda mais a realização de um diagnóstico pós-morte com um grau elevado de certeza.

Fazendo uma apreciação global deste estudo transversal, pode inferir-se que os agentes patogénicos transmitidos por ixodídeos representaram uma proporção considerável dos resultados positivos obtidos. Pelo contrário, os agentes transmitidos por mosquitos, flebótomos e tabanídeos não foram detectados, pelo menos de forma indirecta, pela sorologia. Estes dados podem sugerir a presença de determinados vectores artrópodes na região abrangida pelo estudo, e a ausência de outros. Deste modo, será de esperar que os vectores prevalentes naquela área do norte de Portugal, sejam os ixodídeos. As doenças avaliadas têm vários vectores em comum, nomeadamente carraças dos géneros *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes* e *Rhipicephalus*, cuja presença em Portugal está bem documentada (Silva, Santos, Formosinho & Bacellar, 2006). Nos casos de co-infecção, a partilha de vectores como *I. ricinus* e *R. sanguineus* pode explicar a presença de anticorpos para agentes diferentes. Um estudo realizado no PNPG (Amaro, 2005), entre 2002 e 2005, demonstrou a ocorrência de *I. ricinus*, *D. marginatus*, *R. sanguineus* e *R. turanicus* nesse parque, com predominância acentuada de *I. ricinus*. Se considerarmos que este ixodídeo é capaz de transmitir vários agentes patogénicos,

incluindo *A. phagocytophilum*, *B. burgdorferi* s.l. e *R. conorii*, não é surpreendente que alguns dos canídeos tenham contactado com estes agentes. Aliás, no mapa da Figura 21 pode verificar-se a origem dos animais que apresentaram anticorpos específicos para essas três bactérias, que coincide com concelhos que incluem áreas do PNPG (Arcos de Valdevez, Melgaço e Terras de Bouro). Por outro lado, a região geográfica abrangida no presente estudo, é caracterizada por zonas de extensa vegetação, floresta e matagal, propícias ao aparecimento de vectores artrópodes, mas também por zonas montanhosas e rochosas, onde a temperatura média anual é relativamente baixa (Anexo J), o que pode justificar a eventual ausência de mosquitos e flebótomos nessas áreas, uma vez que estes vectores requerem temperaturas de cerca de 14°C para sobreviver. A presença duma grande diversidade de fauna silvestre, em diferentes nichos ecológicos, bem como a partilha desses *habitats* com animais domésticos, e a proximidade com populações humanas, faz com que a região norte de Portugal possua algumas das características favoráveis à interacção entre agentes patogénicos, vectores/reservatórios e hospedeiros, permitindo a transmissão e a disseminação de doenças entre diferentes espécies.

Por fim, torna-se relevante esclarecer que a detecção de anticorpos específicos para alguns dos agentes avaliados nos canídeos silvestres, não é equivalente à existência de infecção activa e/ou de doença nestes animais, apenas significa que, em determinado momento no tempo, aqueles carnívoros contactaram com os agentes patogénicos e desenvolveram uma resposta imunitária com produção de anticorpos específicos para os mesmos. Por isso, e pelo facto das amostras recolhidas abrangerem um período de estudo bastante longo, não se pode afirmar com certeza que as prevalências observadas neste estudo correspondem, de facto, às prevalências actuais e efectivamente existentes nas populações de lobos e raposas, em Portugal.



## Capítulo V. Conclusões

A realização desta dissertação teve o intuito de contribuir globalmente para o estudo de doenças zoonóticas, na maioria associadas a vectores, nos canídeos silvestres do norte de Portugal. O rastreio sorológico foi efectuado pela primeira vez nesta região de Portugal no lobo ibérico (*C. lupus*) e na raposa vermelha (*V. vulpes*), para os agentes *A. phagocytophilum*, *B. burgdorferi* s.l., *E. canis*, *R. conorii*, *F. tularensis*, *D. immitis*, *B. canis*, *L. infantum*, vírus Toscana e *T. gondii*, pelo que veio introduzir novos conhecimentos gerais sobre as prevalências destes agentes no território português, que até agora só se conheciam em canídeos domésticos e humanos.

A detecção de anticorpos específicos para *A. phagocytophilum*, *B. burgdorferi* s.l., *E. canis*, *R. conorii*, *B. canis* e *T. gondii* demonstrou a presença destes agentes naquela região do país, cujas prevalências estão, de um modo geral, abaixo da média das seroprevalências observadas em canídeos e outros mamíferos silvestres e domésticos da Europa.

Este estudo transversal permitiu identificar alguns factores de risco associados às doenças avaliadas, nomeadamente a espécie de hospedeiro, o sexo, a idade e a origem geográfica dos animais. Por outro lado, as técnicas de sorologia utilizadas provaram ser úteis na monitorização das doenças, mas carecem ainda de padronização e do estabelecimento de limites de positividade para os diferentes agentes, particularmente no que respeita o tipo de amostras em que são aplicadas. Adicionalmente, a combinação de pelo menos duas técnicas diferentes de sorologia, ou alternativamente de métodos moleculares, permitiria melhorar a sensibilidade dos testes e a sua eficácia no diagnóstico das doenças.

De referir que os agentes patogénicos são mantidos na natureza pelos hospedeiros reservatórios, pelo que se torna importante determinar os verdadeiros reservatórios de cada agente etiológico e o nível de persistência do mesmo, dados que são conseguidos através de estudos longitudinais. Para as doenças associadas a vectores, seria também relevante obter mais informação sobre a distribuição geográfica dos respectivos vectores artrópodes.

A análise dos resultados deste rastreio deverá alertar para a importância epidemiológica que estas doenças podem assumir num futuro próximo, pelo carácter emergente que algumas apresentam, de maneira que a implementação de medidas preventivas e de controlo das populações de vectores, tanto no ciclo silvático como no doméstico, pode constituir uma mais valia para a diminuição das prevalências destas zoonoses.

Face ao desconhecimento geral da dimensão real destas doenças nas restantes regiões do país, realça-se a necessidade da continuação dos programas de vigilância já existentes em Portugal e a sua aplicação noutras áreas do território nacional (particularmente onde a interacção entre animais silvestres, domésticos e com o Homem é promovida pela proximidade física entre eles), de modo a melhorar a caracterização das doenças e os factores de risco associados às mesmas.

## Bibliografia

- Abd, H., Johansson, T., Golovliov, I., Sandström, G. & Forsman, M. (2003). Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1. Acedido em Ago 29, 2009, disponível em: <http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/69/1/600>
- Abranches, P., Conceição-Silva, F.M. & Silva-Pereira, M.C. (1984). Kala-azar in Portugal. V. The sylvatic cycle in the enzootic endemic focus of Arrabida. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87, 197-200.
- Aguero-Rosenfeld, M.E., Wang, G., Schwartz, I. & Wormser, G.P. (2005). Diagnosis of Lyme borreliosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 18, 3, 484-509.
- Alexandre, N.M.L. (2006). *Estudo clínico e epidemiológico da febre botonosa, ehrlichiose canina e borreliose de Lyme numa população de canídeos domésticos do Algarve*. Dissertação de Mestrado em Saúde Pública Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Allen, D.G., Dowling, P.M., Smith, D.A., Pasloske, K. (Ed.) & Woods, J.P. (Ed.). (2005). *Handbook of Veterinary Drugs* (3<sup>rd</sup> ed.). EUA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Amaro, F. (2005). Roedores e a sua importância na Saúde Pública. In *Jornadas da Medicina da Conservação 7<sup>a</sup> ed.*, 2005. Gouveia. (Com. Oral).
- Amaro, F., Ciufolini, M.G., Venturi, G., Fiorentini, C. & Alves, M.J. (2007). Diagnóstico laboratorial de flebovírus (vírus Toscana). *Acta Médica Portuguesa*, 20, 341-345.
- Ardans, A.A. & MacLachlan, N.J. (2004). Orthomyxoviridae and Bunyaviridae. In Hirsh, D.C., MacLachlan, N.J. & Walker, R.L., *Veterinary Microbiology* (2<sup>nd</sup> ed.). Blackwell Publishing. Acedido em Ago 25, 2009, disponível em: <http://books.google.pt/books?id=FYdWYCUOFxsC&pg=PP1&dq=veterinary+microbiology&hl=en&cd=1#v=onepage&q=&f=false>
- Bacellar, F., Dawson, J.E., Silveira, C.A. & Filipe, A.R. (1995). Antibodies against rickettsiaceae in dogs of Setúbal, Portugal. Acedido em Jul. 22, 2009, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7655402>
- Baldelli, F., Ciufolini, M.G., Francisci, D., Marchi, A., Venturi, G., Fiorentini, C., Luchetta, M.L., Bruto, L. & Pauluzzi, S. (2004). Unusual presentation of life-threatening Toscana virus meningoencephalitis. *Clinical Infectious Diseases*, 38, 515-520.
- Baneth, G., Day, M., Roura, X. & Shaw, S. (2005). Leishmaniosis. In S.E. Shaw & M.J. Day, *Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat*. (pp. 89-99). London: Mason Publishing.
- Bengis, R.G., Leighton, F.A., Fischer, J.R., Artois, M., Möner, T. & Tate, C.M. (2004). The role of wildlife in emerging and re-emerging zoonoses. *Scientific and Technical Review Office International des Epizooties*, 23, 2, 497-511.
- Berdal, B.P., Mehl, R., Haaheim, H., Loksa, M., Grunow, R., Burans, J., Morgan, C. & Meyer, H. (2000). Field detection of *Francisella tularensis*. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 32, 287-291.
- Blanco, J.R. & Oteo, J.A. (2006). Rickettsiosis in Europe, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078, 26-33.

- Bowman, D.D. (1999). *Georgis' Parasitology for Veterinarians* (7<sup>th</sup> ed.). Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders Company.
- Braitto, A., Ciufolini, M.G., Pippi, L., Corbisiero, R., Fiorentini, C., Gistri, A. & Toscano, L. (1998). Phlebotomus-transmitted Toscana virus infections of the central nervous system: a seven-year experience in Tuscany. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 30, 505-508.
- Brouqui, P., Parola, P., Fournier, P.E. & Raoult, D. (2007). Spotted fever rickettsioses in southern and eastern Europe, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 49, 2-12.
- Cabral, Mj.; Almeida, J., Almeida, P.R., Dellinger, T., Ferrand de Almeida, N., Oliveira, M.E., Palmeirim, J.M., Queiroz, A.I., Rogado, L. & Santos-Reis, M. (2006). *Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal* (2<sup>a</sup> ed.). Lisboa: Instituto da Conservação da Natureza / Assírio & Alvim.
- Carvalho, F.S., Wenceslau, A.A., Carlos, R.S.A. & Albuquerque, G.R. (2008). Epidemiological and molecular study of *Ehrlichia canis* in dogs in Bahia, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 7, 3, 657-662.
- Charrel, R.N., Gallian, P., Navarro-Marí, J.M., Nicoletti, L., Papa, A., Sánchez-Seco, M.P., Tenorio, A. & Lamballeire, X. (2005). Emergence of Toscana virus in Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 11, 11, 1657-63.
- Criado-Fornelio, A., Gutierrez-Garcia, L., Rodriguez-Caabeiro, F., Reus-Garcia, E., Roldan-Soriano, M.A. & Diaz-Sanchez, M.A. (2000). A parasitological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the province of Guadalajara, Spain. *Veterinary Parasitology*, 92, 245-251.
- Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Saraña, A. & Barba-Carretero, J.C. (2003). Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe, Part I Epizootiological aspects. *Veterinary Parasitology*, 113, 189-201.
- Dantas-Torres, F. (2008). Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasites & Vectors*, 1, 25. Acedido em Ago 18, 2009, disponível em: <http://www.parasitesandvectors.com>
- Direcção dos Serviços de Epidemiologia e Estatísticas da Saúde (Direcção-Geral da Saúde) (2008). *Doenças de declaração obrigatória: 2003-2007*. Lisboa: DGS.
- Duarte, M.T.T.R. (2008). *Riquetsioses do grupo das febres exantemáticas em canídeos domésticos em Portugal: revisão bibliográfica e estudo retrospectivo*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Dujardin, J., Campino, L., Cañavate, C., Dedet, J., Gradoni, L., Soteriadou, K., Mazeris, A., Ozbek, Y. & Boelaert, M. (2008). Spread of vector-borne diseases and neglect of leishmaniasis, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 14, 7, 1013-8.
- Feldman, K.A. (2003). Tularemia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 222, 6, 725-730.
- Ferasin, L. & Knight, D. (2005). Filarial infections. In S.E. Shaw & M.J. Day, *Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat*. (pp. 51-61). London: Mason Publishing.
- Ferreira, M.F. (2008). *Parasitoses caninas transmitidas por ixodídeos*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.

- Ferroglio, E., Rossi, L. & Gennero, S. (2000). Lung-tissue extract as an alternative to serum for surveillance for brucellosis in chamois. *Preventive Veterinary Medicine*, 43, 2, 117-122.
- Figueiredo, T.C.D. (2007). *Estudo da prevalência de doenças associadas a vectores em canídeos domésticos do distrito de Bragança*. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Clínica. Lisboa: Faculdade de Medicina de Lisboa – Universidade de Lisboa.
- Fishman, Z., Gonen, L., Harrus, S., Strauss-Ayali, D., King, R. & Baneth, G. (2003). A serosurvey of Hepatozoon canis and Ehrlichia canis antibodies in wild red foxes (Vulpes vulpes) from Israel. *Veterinary Parasitology*, 119, 21-26.
- Foley, J.E., Queen, E.V., Sacks, B. & Foley, P. (2005). GIS-facilitated spatial epidemiology of tick-borne diseases in coyotes (Canis latrans) in northern and coastal California. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 28, 197-212.
- Fritz, C.L. & Kjemtrup, A.M. (2003). Lyme borreliosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 223, 9, 1261-70.
- Fuente, J., Ruiz-Fons, F., Naranjo, V., Torina, A., Rodríguez, O. & Gortázar, C. (2007). Evidence of anaplasma infections in european roe deer (Capreolus capreolus) from southern Spain. *Research in Veterinary Science*, 84, 382-386.
- Gabriel, M.W. (2006). *Exposure to Anaplasma phagocytophilum and ticks in gray foxes (Urocyon cinereoargenteus) in Northern Humboldt County, California*. Thesis for the Degree Master of Science In Natural Resources: Wildlife. California: The Faculty of Humboldt State University.
- Galvão, M.A.M., Silva, L.J., Nascimento, E.M.M., Calic, S.B., Sousa, R. & Bacellar, F. (2005). Riquetsioses no Brasil e Portugal: ocorrência, distribuição e diagnóstico, *Revista de Saúde Pública*, 39, 5.
- Garin-Bastuji, B., Cau, C., Boué, F., Terrier, M. & Hars, J. (2004). Utilisation comparée du serum, du poumon et du muscle pour le dépistage de la brucellose chez les sangliers. *Epidemiologie et Santé Animal*, 45, 13-23.
- Genchi, C., Kramer, L.H. & Prieto, G. (2001). Epidemiology of canine and feline dirofilariosis: a global view. In Simón, F. & Genchi, C. (Eds.), *Heartworm infection in humans and animals*. (pp. 121-133). Salamanca: Ediciones Universidad. Acedido em Jun 16, 2009, disponível em: [http://books.google.pt/books?id=R9olquzI31UC&printsec=frontcover&hl=en&source=gbs\\_navlinks\\_s#v=onepage&q=&f=false](http://books.google.pt/books?id=R9olquzI31UC&printsec=frontcover&hl=en&source=gbs_navlinks_s#v=onepage&q=&f=false)
- Genchi, C., Simón, F. & Kramer, L.H. (2005). Dirofilariosis in humans: is it a real zoonotic concern? [versão electrónica]. *30<sup>th</sup> World Congress of the World Small Animal Veterinary Association, May 11-14, 2005, Mexico City, Mexico*. Acedido em Jun 18, 2009, disponível em: <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2005&PID=10908&O=Generic>
- Greene, C. (2005). Rickettsial infections. In S.E. Shaw & M.J. Day, *Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat*. (pp. 134-137). London: Mason Publishing.
- Handman, E. (2001). Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 2, 229-243.

- Harrus, S., Lior, Y., Ephros, M., Grisaru-Soen, G., Keysary, A., Strenger, C., Jongejan, F., Waner, T. & Baneth, G. (2007). Rickettsia conorii in humans and dogs: a seroepidemiologic survey of two rural villages in Israel. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77, 1, 133-5.
- Harrus, S., Waner, T., Bjöersdorff, A. & Shaw, S. (2005). Ehrlichiosis and anaplasmosis. In S.E. Shaw & M.J. Day, *Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat*. (pp. 120-132). London: Mason Publishing.
- Hietala, S., Gardner, I. (1999). Validity of using diagnostic tests that are approved for use in domestic animals for nondomestic species. In M. Fowler & E. Miller (eds.) *Zoo and wild animal medicine, current therapy 4* (pp.55-58). Philadelphia, W. B. Saunders Company.
- Hill, D. & Dubey, J.P. (2002). Toxoplasma gondii: transmission, diagnosis and prevention. *Clinical Microbiology and Infection*, 8, 634-640.
- Hovius, K.E. (2005). Borreliosis. In S.E. Shaw & M.J. Day, *Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat*. (pp. 100-109). London: Mason Publishing.
- Hurková, L. & Modrý, D. (2006). PCR detection of Neospora caninum, Toxoplasma gondii and Encephalitozoon cuniculi in brains of wild carnivores. *Veterinary Parasitology*, 137, 150-154.
- Hytönen, J., Hartiala, P., Oksi, J. & Viljanen, M.K. (2008). Borreliosis: recent research, diagnosis, and management. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 37, 161-172.
- Inokuma, H., Oyamada, M., Davoust, B., Boni, M., Dereure, J., Bucheton, B., Hammad, A., Watanabe, M., Itamoto, K., Okuda, M. & Brouqui, P. (2006). Epidemiological survey of Ehrlichia canis and related species infection in dogs in eastern Sudan. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078, 461-463.
- Irwin, P. (2005). Babesiosis and cytauxzoonosis. In S.E. Shaw & M.J. Day, *Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat*. (pp. 63-74). London: Mason Publishing.
- Irwin, P.J. (2009). Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. In C. Arme (Ed.) *Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Canine Vector-Borne Disease Symposium: Seville, Spain 25-28 March 2009*, 2, 1, S4.
- Jensen, J., Simon, D., Escobar, H.M., Soller, J.T., Bullerdiek, J., Beelitz, P., Pfister, K. & Nolte, I. (2007). Anaplasma phagocytophilum in dogs in Germany. *Zoonoses and Public Health*, 54, 94-101.
- Kalish, R.A., McHugh, G., Granquist, J., Shea, B., Ruthazer, R. & Steere, A. (2001). Persistence of immunoglobulin M or immunoglobulin G antibody responses to Borrelia burgdorferi 10-20 years after active Lyme disease. *Clinical Infectious Diseases*, 33, 780-785.
- Kallio-Kokko, H., Uzcategui, N., Vapalahti, O. & Vaheri, A. (2005). Viral zoonoses in Europe. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 5, 1051-77.
- Kruse, H., Kirkemo, A-M. & Handeland, K. (2004). Wildlife as source of zoonotic infections. *Emerging Infectious Diseases*, 10, 12, 2067-72.
- Lopes de Carvalho, I., Escudero, R., García-Amil, C., Falcão, H., Anda, P. & Nuncio, M.S. (2007). Francisella tularensis, Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, 13, 4, 666-667.

- Lopes de Carvalho, I., Nuncio, M.S. & David de Moraes, J. (2009). Tularémia. *Acta Médica Portuguesa*, 22, 281-290.
- Lopes, A.P., Cardoso, L. & Rodrigues, M. (2008). Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in domestic cats from northeastern Portugal [abstract]. *Veterinary Parasitology*, 155, 3-4, 184-189. Acedido em Jul 17, 2009, disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/5283788\\_Serological\\_survey\\_of\\_Toxoplasma\\_gondii\\_infection\\_in\\_domestic\\_cats\\_from\\_northeastern\\_Portugal](https://www.researchgate.net/publication/5283788_Serological_survey_of_Toxoplasma_gondii_infection_in_domestic_cats_from_northeastern_Portugal)
- Lopes, D.D. & Rodrigues, F.T. (2007). Babesiose canina: estudo epidemiológico no Nordeste Transmontano 2006/2006. In *7º encontro da Sociedade Portuguesa de Epidemiologia e Medicina Veterinária Preventiva, Peniche 24-25 Novembro, 2007*.
- Lowry, R. (2008) VassarStats: web site for statistical computation. Procedures applicable to categorical frequency data. Acedido em Set 24, 2009, disponível em: <http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>
- Macrì, G., Sala, M., Linder, A.M., Pettirossi, N. & Scarpulla, M. (2009). Comparison of indirect fluorescent antibody test and modified agglutination test for detecting *Toxoplasma gondii* immunoglobulin G antibodies in dog and cat. *Parasitology Research*, 105, 1, 35-40.
- Marks, C.A. & Bloomfield, T.E. (1998). Canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) detected in red foxes (*Vulpes vulpes*) in urban Melbourne. *Veterinary Parasitology*, 78, 147-154.
- Marques, M.I.L.M. (2008). *Leishmaniose canina*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- McQuiston, J.H., McCall, C.L. & Nicholson, W.L. (2003). Ehrlichiosis and related infections. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 223, 12, 1750-6.
- Mehlhorn, H. (Ed.) (2001). *Encyclopoedic Reference of Parasitology: Biology, Structure, Function* (2<sup>nd</sup> ed.). New York: Springer NY.
- Meireles, J. (n.d.). *Dirofilariose*. Acedido em Jul 2, 2009, disponível em: <http://documentos.fmv.utl.pt/quarto/Patologia%20e%20Clinica%20das%20Doencas%20Parasitarias/Dirofilariose%20completo.pdf>
- Meireles, L.R., Galisteo, A.J., Pompeu, E. & Andrade Jr, H.F. (2004). *Toxoplasma gondii* spreading in an urban area evaluated by seroprevalence in free-living cats and dogs. *Tropical Medicine and International Health*, 9, 8, 876-881.
- Mendoza-Montero, J., Gámez-Rueda, M.I., Navarro-Marí, J.M., Rosa-Fraile, M. & Oyonarte-Gómez, S. (1998). Infections due to sandfly fever virus serotype Toscana in Spain. *Clinical Infectious Diseases*, 27, 434-436.
- Montoya, A., Miró, G., Mateo, M., Ramírez, C. & Fuentes, I. (2008). Molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from cats from Spain [abstract]. *The Journal of Parasitology*, 94, 5, 1044-6. Acedido em Jul 17, 2009, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18576763>
- Montoya, J.G. & Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *The Lancet*, 363, 1965-76.
- Montoya, J.G. (2002). Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 185, 1, 73-82.

- Morchón, R., Moya, I., González-Miguel, J., Montoya, M.N. & Simón, F. (2009). Zoonotic *Dirofilaria immitis* infections in a province of Northern Spain. *Epidemiology and Infection Cambridge University Press*. Acedido em Jun 16, 2009, disponível em: <http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract.jsessionid=E5464E84B60651EB981C682671B6EF03.tomcat1?fromPage=online&aid=5962008>
- Mörner, T., Sandström, G. & Mattsson, R. (1988). Comparison of serum and lung extracts for surveys of wild animals for antibodies to *Francisella tularensis* biovar *polarctica*. *Journal of Wildlife Diseases*, 24, 1, 10-14.
- Núncio, S. (2009). *Tularémia: situação em Portugal*. Acedido em Set. 15, 2009, disponível em: [http://gulbenkian.mrnet.pt/media/files/FTP\\_files/pdfs/ambiente09/12-SofiaNuncio\\_07-04-09.pdf](http://gulbenkian.mrnet.pt/media/files/FTP_files/pdfs/ambiente09/12-SofiaNuncio_07-04-09.pdf)
- O'Connor, T.P., Hanscom, J.L., Hegarty, B.C., Groat, R.G. & Breitschwerdt, E.B. (2006). Comparison of an indirect immunofluorescence assay, western blot analysis, and a commercially available ELISA for detection of *Ehrlichia canis* antibodies in canine sera [abstract] [versão electrónica]. *American Journal of Veterinary Research*, 67, 2, 206-210.
- Observatório Nacional das Leishmanioses (2009). *A leishmaniose canina*. Acedido em Set. 2, 2009, disponível em: <http://www.onleish.org/index.php?article=22&visual=3>
- Office International des Épizooties (2008). *OIE Manual of diagnostic tests & vaccines for terrestrial animals (terrestrial manual) 2008*. (6<sup>th</sup> ed.). Paris: OIE.
- Otranto, D., Capelli, G. & Genchi, C. (2009). Changing distribution patterns of canine vector borne diseases in Italy: leishmaniosis vs. dirofilariosis. *Parasites & Vectors*, 2. Acedido em Set. 2, 2009, disponível em: <http://www.parasitesandvectors.com/content/2/S1/S2>
- Oyston, P.C.F., Sjostedt, A. & Titball, R.W. (2004). Tularemia: bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 967-978.
- Pan American Health Organization (2001). *Zoonoses and communicable diseases common to man and animals - vol.III* (3<sup>rd</sup> ed.). Washington, D.C.: PAHO.
- Parola, P., Paddock, C.D. & Raoult, D. (2005). Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clinical Microbiology Reviews*, 719-756.
- Penzhorn, B.L. (2006). Babesiosis of wild carnivores and ungulates. *Veterinary Parasitology*, 138, 11-21.
- Pereira da Fonseca, I.M., Cortes, S., Magalhães, A., Madeira de Carvalho, L.M., Meireles, J.A.F.S., Santos Gomes, G.M., Campino, L. & Fazendeiro, M.I. (2002). Prevalência de *Leishmania* spp. em raposas vermelhas (*Vulpes vulpes silacea*, Miller, 1907) em Portugal. 2<sup>o</sup> Enc. Soc. Port. Epidem. Med. Vet. Prev., Montemor-o-Novo, Hospital Infantil S. João de Deus, 9-10 Nov., 2002. (Com. Oral).
- Petersen, J.M., Mead, P.S. & Schriefer, M.E. (2009). *Francisella tularensis*: an arthropod-borne pathogen. *Veterinary Research*, 40, 2, 7.
- Pimenta, V., Barroso, I., Álvares, F., Correia, J., Ferrão da Costa, G., Moreira, L., Nascimento, J., Petrucci-Fonseca, F., Roque, S. & Santos, E. (2005). *Situação Populacional do Lobo em Portugal: resultados do Censo Nacional 2002/2003. Relatório Técnico*. Lisboa: Instituto da Conservação da Natureza / Grupo Lobo.

- Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J. & Leonard, F.C. (2002). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Oxford: Blackwell Science Ltd, Blackwell Publishing.
- Ranjbar-Bahadori, S., Eslami, A. & Bokaic, S. (2007). Evaluation of different methods for diagnosis of *Dirofilaria immitis*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10, 11, 1938-40.
- Rochette, F. (2003). *Los parasitas del perro y su control*. España: Veterinaria Esteve, Janssen Animal Health.
- Rovero, C., Brouqui, P. & Raoult, D. (2008). Questions on mediterranean spotted fever a century after its discovery. *Emerging Infectious Diseases*, 14, 9, 1360-7.
- Rymaszewska, A. & Grenda, S. (2008). Bacteria of the genus *Anaplasma* – characteristics of anaplasma and their vectors: a review. *Veterinarni Medicina*, 53, 11, 573-584.
- Sacks, B.N., Woodward, D.L. & Colwell, A.E. (2003). A long-term study of non-native-heartworm transmission among coyotes in a Mediterranean ecosystem. *OIKOS*, 102, 3, 478-490.
- Santos, A.S., Alexandre, N. & Sousa, R. (2009). Serologic and molecular survey of anaplasma infection in dogs with suspected tick-borne disease, Portugal [abstract] [versão electrónica]. *The Veterinary Record*, 164, 168-171.
- Santos, A.S., Bacellar, F. & Dumler, J.S. (2006). Human exposure to *Anaplasma phagocytophilum* in Portugal. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078, 100-105.
- Santos, A.S., Santos-Silva, M.M., Almeida, V.C., Bacellar, F. & Dumler, J.S. (2004). Detection of *Anaplasma phagocytophilum* DNA in Ixode sticks (Acari: Ixodidae) from Madeira island and Setúbal district, mainland Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, 10, 9, 1643-8.
- Santos, N.G., Madeira de Carvalho, L.M., Pacheco, C. & Fazendeiro, M.I. (2004). Mixed hemoprotozoa infection causing disease in an injured, wild iberian wolf *Canis lupus signatus*. The *Sixth Conference of the European Wildlife Disease Association, TSE and CWD Workshop, 8-12 September 2004*, Poster 30.
- Semião-Santos, S.J., Abranches, P., Silva-Pereira, M.C.D., Santos-Gomes, G.M., Fernandes, J.P. & Vetter, J.C.M. (1996). Reliability of serological methods for detection of leishmaniasis in portuguese domestic and wild reservoirs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91, 6, 747-750.
- Silva, M.M., Santos, A.S., Formosinho, P. & Bacellar, F. (2006). Carraças associadas a patologias infecciosas em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, 19, 39-48.
- Sirigireddy, K.R., Mock, D.C. & Ganta, R.R. (2006). Multiplex detection of Ehrlichia and Anaplasma pathogens in vertebrate and ticks hosts by real-time RT-PCR. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078, 552-556.
- Sjöstedt, A. (2007). Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1105, 1-29.



- Solano-Gallego, L., Hegarty, B., Espada, Y., LLull, J. & Breitschwerdt, E. (2006). Serological and molecular evidence of exposure to arthropod-borne organisms in cats from northeastern Spain [abstract]. *Veterinary Microbiology*, 118, 3-4, 274-277. Acedido em Set 10, 2009, disponível em: [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6TD6-4KNMB2S-1&\\_user=10&\\_rdoc=1&\\_fmt=&\\_orig=search&\\_sort=d&\\_docanchor=&view=c&\\_searchStrId=1137378150&\\_rerunOrigin=google&\\_acct=C000050221&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=10&md5=eb9def8b0c98c9e0ae5ce413afcd9d22](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TD6-4KNMB2S-1&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=1137378150&_rerunOrigin=google&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=eb9def8b0c98c9e0ae5ce413afcd9d22)
- Solano-Gallego, L., Kidd, L., Trotta, M., Di Marco, M., Caldin, M., Furlanello, T. & Breitschwerdt, E. (2006). Febrile illness associated with Rickettsia conorii infection in dogs from Sicily. *Emerging Infectious Diseases*, 12, 12, 1985-8.
- Solano-Gallego, L., Trotta, M., Razia, L., Furlanello, T. & Caldin, M. (2006). Molecular survey of Ehrlichia canis and Anaplasma phagocytophilum from blood of dogs in Italy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078, 515-518.
- Sousa, R., Barata, C., Vitorino, L., Santos-Silva, M., Carrapato, C., Torgal, J., Walker, D. & Bacellar, F. (2006). Rickettsia sibirica isolation from a patient and detection in ticks, Portugal. Acedido em Jul. 20, 2009, disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/6948436\\_Rickettsia\\_sibirica\\_isolation\\_from\\_a\\_patient\\_and\\_detection\\_in\\_ticks\\_Portugal](https://www.researchgate.net/publication/6948436_Rickettsia_sibirica_isolation_from_a_patient_and_detection_in_ticks_Portugal)
- Sousa, R., Nóbrega, S.D., Bacellar, F. & Torgal, J. (2003). Sobre a realidade da febre escaro-nodular em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, 16, 429-436.
- Sousa, S., Ajzenberg, D., Canada, N., Freire, L., Correia da Costa, J.M., Dardé, M.L., Thulliez, P. & Dubey, J.P. (2006). Biologic and molecular characterization of Toxoplasma gondii isolates from pigs from Portugal [abstract]. *Veterinary Parasitology*, 135, 2, 133-136. Acedido em Jul 17, 2009, disponível em: [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6TD7-4H68T82-3&\\_user=10&\\_rdoc=1&\\_fmt=&\\_orig=search&\\_sort=d&\\_docanchor=&view=c&\\_searchStrId=1137281325&\\_rerunOrigin=google&\\_acct=C000050221&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=10&md5=c7541b39c565f4a98ad85108b2707c51](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TD7-4H68T82-3&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=1137281325&_rerunOrigin=google&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=c7541b39c565f4a98ad85108b2707c51)
- Sousa, S., Pimentel, M., Silva, A. & Madeira de Carvalho, L.M. (2008). Dirofilariose Canina no Distrito de Coimbra. *Livro de Resumos do IV Congresso de Ciências Veterinárias da SPCV, I Congresso Ibérico de Epidemiologia, INRB-INIA/Fonte Boa, 27-29 de Novembro 2008*. Poster 89, pp.197.
- Splettstoesser, W.D., Tomaso, H., Al Dahouk, S., Neubauer, H. & Schuff-Werner, P. (2005). Diagnostic procedures in tularemia with special focus on molecular and immunological techniques. *Journal of Veterinary Medicine B*, 52, 249-261.
- Sréter, T., Sréter-Lancz, Z., Széll, Z. & Kálmán, D. (2004). Anaplasma phagocytophilum: an emerging tick-borne pathogen in Hungary and central eastern Europe. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 98, 4, 401-405.
- Tsachev, I. (2006). Detection of antibodies reactive with Ehrlichia canis in a kennel in Bulgaria. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 30, 425-426.
- Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M. & Jennings, F.W. (1996). *Veterinary Parasitology* (2<sup>nd</sup> ed.). Oxford, UK: Blackwell Publishing.
- Valassina, M., Cusi, M.G. & Valensin, P.E. (2003). A Mediterranean arbovirus: the Toscana virus. *Journal of NeuroVirology*, 9, 577-583.

- Wall, R. & Pitts, K. (2005). Arthropod vectors of infectious disease: biology and control. In S.E. Shaw & M.J. Day, *Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat*. (pp. 11-22). London: Mason Publishing.
- Wang, L.-C. (1998). Comparison of a whole-blood agglutination test and an ELISA for the detection of the antigens of *Dirofilaria immitis* in dogs. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 92, 1, 73-77.
- Yabsley, M.J., McKibben, J., Macpherson, C.N., Cattán, P.F., Cherry, N.A., Hegarty, B.C., Breitschwerdt, E.B., O'Connor, T., Chandrashekar, R., Paterson, T., Perea, M.L., Ball, G., Friesen, S., Goedde, J., Henderson, B. & Sylvester, W. (2007). Prevalence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Bartonella vinsonii berkhofii*, and *Rickettsia* spp. in dogs from Grenada. *Veterinary Parasitology*, 151, 279-285.
- Zarnke, R.L., Ver Hoef, J.M. & DeLong, R.A. (2004). Serologic survey for selected disease agents in wolves (*Canis lupus*) from Alaska and the Yukon territory, 1984-2000. *Journal of Wildlife Diseases*, 40, 4, 632-638.



**Anexo A.** Instalações do CRFS-PNPG, animais em recuperação e actividades desenvolvidas durante o estágio.



**Legenda:** **a** – Corujas-das-torres (*T. alba*) no túnel de voo; **b** – Túnel de voo; **c** – Câmara de muda com 2 *T. alba*; **d** – Águia-d’asa-redonda (*B. buteo*); **e** – Ógea (*F. subbuteo*); **f** – Bufo-pequeno (*A. otus*); **g** – Noitibó-cinzento (*C. europaeus*); **h** – Morcego-anão (*P. pipistrellus*); **i** – Raposa (*V. vulpes*) no exterior de um túnel de voo no CRFS-PNPG.

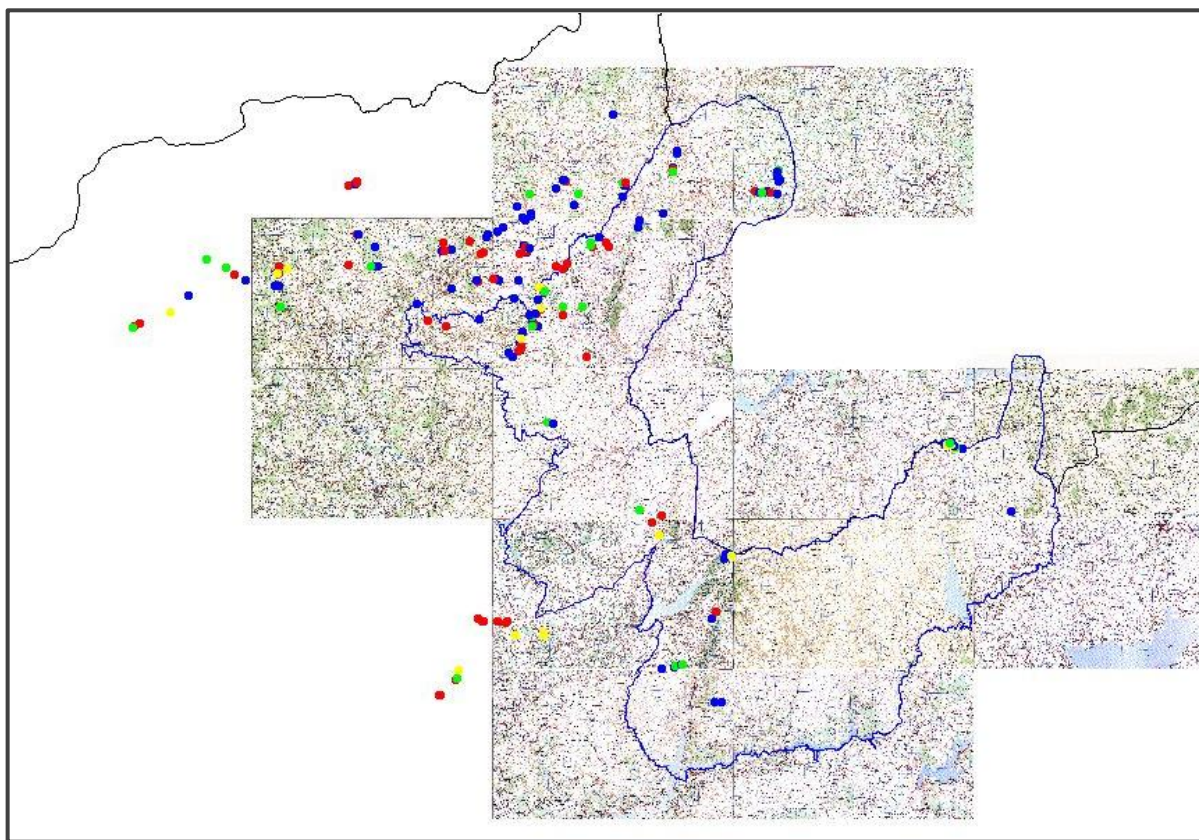


**Anexo A. (continuação)**



**Legenda:** **j** – Raposa (*V. vulpes*) com sarna sarcóptica; **l** – Borrego morto, avaliação de ataque por lobo; **m** – Pombal tradicional, no Parque Natural do Douro Internacional; **n** – Zaragatoa orofaríngea em pombo-das-rochas (*C. livia*); **o** – *V. vulpes* a alimentar-se de um cadáver de garrano; **p** – Lobo (*C. lupus*) a alimentar-se do mesmo cadáver de garrano.

**Anexo B.** Mapa da distribuição geográfica das amostras de dejectos colhidos na área do PNPG, de acordo com a espécie.



**Legenda:** ● *C. lupus*; ● *V. vulpes*; ● *C. familiaris*; ● espécie não identificada; a zona delimitada a azul corresponde à área do PNPG.

**Anexo C.** Tabela de registo das amostras dos animais analisados.

#	Espécie	Número	Recolha	Concelho	Estado de conservação	Sexo	Idade	Amostra
1	<i>C. lupus</i>	02-0311	18-02-95	Miranda do Douro	Bom	F	Juvenil	LTE
2	<i>C. lupus</i>	02-0309	02-02-98	Bragança	Médio	M	Juvenil	LTE
3	<i>C. lupus</i>	02-0314	26-02-98	Zamora, Espanha	Mau	M	Adulto	LTE
4	<i>V. vulpes</i>	99-0004	01-02-99	NA	Mau	M	ND	LTE
5	<i>V. vulpes</i>	99-0004	01-02-99	NA	Mau	M	ND	Soro
6	<i>C. lupus</i>	02-0310	08-02-99	Bragança	Bom	M	Juvenil	LTE
7	<i>C. lupus</i>	02-0308	15-02-99	Mogadouro	Bom	M	Subadulto	LTE
8	<i>C. lupus</i>	99-0830	11-11-99	Boticas	Mau	M	Adulto	LTE
9	<i>C. lupus</i>	03-0113	01-12-99	Mondim de Basto	Bom	M	Adulto	LTE
10	<i>C. lupus</i>	02-0312	02-02-00	Mirandela	Bom	F	Juvenil	LTE
11	<i>C. lupus</i>	00-0805	24-02-00	Montalegre	Bom	F	Juvenil	LTE
12	<i>C. lupus</i>	03-0092	08-03-00	Satão	Mau	F	Adulto	LTE
13	<i>C. lupus</i>	03-0055	08-05-01	Moimenta da Beira	Mau	M	Subadulto	LTE
14	<i>C. lupus</i>	03-0090	28-11-01	Vila Nova de Paiva	Médio	M	Juvenil	LTE
15	<i>C. lupus</i>	04-0052	25-01-02	Vila Nova de Paiva	Médio	M	Adulto	LTE
16	<i>C. lupus</i>	04-0046	03-04-02	Moimenta da Beira	Bom	F	Juvenil	LTE
17	<i>C. lupus</i>	03-0110	04-04-02	Mogadouro	Mau	M	Juvenil	LTE
18	<i>C. lupus</i>	04-0144	15-09-02	Vila Real	Mau	F	Juvenil	LTE
19	<i>C. lupus</i>	02-0358	25-09-02	Terras de Bouro	Bom	M	Subadulto	LTE
20	<i>C. lupus</i>	03-0002	03-01-03	Montalegre	Bom	F	Juvenil	LTE
21	<i>C. lupus</i>	04-0145	07-02-03	Vila Pouca de Aguiar	Mau	F	Juvenil	LTE
22	<i>C. lupus</i>	03-0099	19-04-03	Chaves	Bom	F	Juvenil	LTE
23	<i>V. vulpes</i>	07-0069	01-01-04	Distrito Bragança	Mau	M	Subadulto	LTE
24	<i>C. lupus</i>	04-0031	09-02-04	Moimenta da Beira	Mau	M	Adulto	LTE
25	<i>C. lupus</i>	04-0123	21-02-04	Vinhais	Bom	M	Subadulto	LTE
26	<i>C. lupus</i>	04-0042	18-03-04	Ponte da Barca	ND	M	Juvenil	LTE
27	<i>C. lupus</i>	04-0042	18-03-04	Ponte da Barca	ND	M	Juvenil	Soro
28	<i>C. lupus</i>	04-0066	03-06-04	Montalegre	Mau	M	Adulto	LTE
29	<i>V. vulpes</i>	04-0044	20-06-04	Terras de Bouro	Médio	M	Juvenil	LTE
30	<i>V. vulpes</i>	04-0143	13-08-04	Vila do Conde	ND	ND	ND	LTE

**Legenda:** F-fêmea; M-macho; ND-não determinado



## Anexo C. (continuação)

#	Espécie	Número	Recolha	Concelho	Estado de conservação	Sexo	Idade	Amostra
31	<i>C. lupus</i>	04-0125	09-09-04	Vimioso	Mau	F	Adulto	LTE
32	<i>C. lupus</i>	07-0033	15-10-04	Bragança	Bom	M	Subadulto	LTE
33	<i>C. lupus</i>	04-0129	06-11-04	Montalegre	Bom	M	Adulto	LTE
34	<i>V. vulpes</i>	04-0133	07-12-04	Vieira do Minho	Bom	M	Adulto	LTE
35	<i>V. vulpes</i>	04-0134	07-12-04	Vieira do Minho	Bom	M	Adulto	LTE
36	<i>V. vulpes</i>	08-0031	15-02-05	Sabugal	Bom	F	Adulto	LTE
37	<i>V. vulpes</i>	08-0037	15-02-05	Sabugal	Médio	F	Adulto	LTE
38	<i>V. vulpes</i>	05-0007	07-03-05	Montalegre	Médio	M	Adulto	LTE
39	<i>C. lupus</i>	07-0096	26-04-05	Chaves	Mau	M	Adulto	LTE
40	<i>V. vulpes</i>	05-0085	13-05-05	Distrito Bragança	ND	ND	ND	LTE
41	<i>C. lupus</i>	07-0088	16-05-05	Alijó	Mau	F	ND	LTE
42	<i>C. lupus</i>	05-0087	25-07-05	Torre de Moncorvo	Mau	M	Subadulto	LTE
43	<i>C. lupus</i>	05-0086	05-10-05	Montalegre	Médio	F	Subadulto	LTE
44	<i>C. lupus</i>	07-0076	16-11-05	Bragança	Médio	F	Juvenil	LTE
45	<i>V. vulpes</i>	06-0002	01-02-06	Terras de Bouro	Bom	M	Adulto	LTE
46	<i>V. vulpes</i>	06-0003	01-02-06	Terras de Bouro	Médio	F	Adulto	LTE
47	<i>C. lupus</i>	06-0034	24-02-06	Arcos de Valdevez	Médio	M	Adulto	LTE
48	<i>V. vulpes</i>	07-0029	27-01-07	Guimarães	Mau	M	Adulto	LTE
49	<i>V. vulpes</i>	08-0138	19-04-07	Figueira de Castelo Rodrigo	Mau	M	Adulto	LTE
50	<i>V. vulpes</i>	08-0140	05-06-07	NA	ND	ND	ND	LTE
51	<i>V. vulpes</i>	07-0111	14-10-07	Vizela	ND	ND	ND	Soro
52	<i>V. vulpes</i>	07-0114	16-11-07	Ponte da Barca	Bom	F	Adulto	LTE
53	<i>C. lupus</i>	4363	16-12-07	Arcos de Valdevez	Bom	F	Adulto	Soro
54	<i>C. lupus</i>	08-0001	03-01-08	Fafe	Fresco	F	Adulto	LTE
55	<i>V. vulpes</i>	08-0013	26-01-08	Melgaço	Fresco	F	Adulto	Soro
56	<i>V. vulpes</i>	08-0014	29-01-08	Melgaço	Fresco	ND	ND	Soro
57	<i>V. vulpes</i>	08-0015	29-01-08	Melgaço	Fresco	ND	ND	Soro
58	<i>V. vulpes</i>	08-0036	02-02-08	Arcos de Valdevez	Fresco	ND	ND	Soro
59	<i>V. vulpes</i>	08-0040	11-02-08	Melgaço	Fresco	F	Subadulto	Soro
60	<i>C. lupus</i>	08-0052	29-02-08	Monção	Bom	M	Adulto	LTE

Legenda: F-fêmea; M-macho; ND-não determinado



**Anexo C. (continuação)**

#	Espécie	Número	Recolha	Concelho	Estado de conservação	Sexo	Idade	Amostra
61	<i>C. lupus</i>	08-0063	06-05-08	Bragança	Bom	F	Juvenil	LTE
62	<i>V. vulpes</i>	08-0113	26-07-08	Melgaço	Bom	M	Juvenil	LTE
63	<i>V. vulpes</i>	08-0105	28-07-08	Melgaço	ND	ND	ND	Soro
64	<i>V. vulpes</i>	08-0120	15-08-08	Melgaço	Bom	M	Adulto	LTE
65	<i>C. lupus</i>	4364	20-08-08	Arcos de Valdevez	Bom	M	Subadulto	Soro
66	<i>C. lupus</i>	08-0132	18-09-08	Cinfães	Médio	M	Juvenil	LTE
67	<i>C. lupus</i>	Soengas	24-09-08	Melgaço	Bom	F	Adulto	Soro
68	<i>C. lupus</i>	4365	12-11-08	Melgaço	Bom	F	Adulto	Soro
69	<i>V. vulpes</i>	08-0127	19-11-08	Arcos de Valdevez	Bom	M	Adulto	LTE
70	<i>V. vulpes</i>	08-0127	19-11-08	Arcos de Valdevez	Bom	M	Adulto	Soro
71	<i>V. vulpes</i>	08-0135	25-11-08	Póvoa de Lanhoso	Bom	M	Adulto	LTE
72	<i>V. vulpes</i>	08-0137	01-12-08	Arcos de Valdevez	Bom	F	Adulto	LTE
73	<i>C. lupus</i>	08-0143	11-12-08	Arcos de Valdevez	Bom	F	Adulto	LTE
74	<i>V. vulpes</i>	08-0141	13-12-08	Arcos de Valdevez	Bom	M	Adulto	LTE
75	<i>C. lupus</i>	08-0144	16-12-08	Arcos de Valdevez	Bom	M	Subadulto	LTE
76	<i>C. lupus</i>	08-0144	16-12-08	Arcos de Valdevez	Bom	M	Subadulto	Exsudado
77	<i>C. lupus</i>	09-0009	04-03-09	Boticas	Fresco	F	Adulto	LTE
78	<i>C. lupus</i>	09-0009	04-03-09	Boticas	Fresco	F	Adulto	Soro
79	<i>V. vulpes</i>	09-0010	09-03-09	Terras de Bouro	Fresco	F	Adulto	LTE
80	<i>V. vulpes</i>	09-0010	09-03-09	Terras de Bouro	Fresco	F	Adulto	Soro
81	<i>C. lupus</i>	04-0028	ND	Distrito Viseu/Guarda	Mau	M	Adulto	LTE
82	<i>C. lupus</i>	04-0028	ND	Distrito Viseu/Guarda	Mau	M	Adulto	Soro
83	<i>V. vulpes</i>	06-0071	ND	região Minho	Bom	M	Juvenil	LTE
84	<i>V. vulpes</i>	07-0067	ND	Distrito Bragança	Bom	F	Juvenil	LTE
85	<i>V. vulpes</i>	07-0070	ND	Distrito Bragança	Médio	M	Adulto	LTE
86	<i>V. vulpes</i>	08-0030	ND	Distrito Guarda/Cast.Branco	Mau	F	Subadulto	LTE
87	<i>V. vulpes</i>	08-0121	ND	NA	Bom	M	Adulto	LTE
88	<i>V. vulpes</i>	08-0136	ND	NA	Bom	F	Adulto	LTE
89	<i>V. vulpes</i>	7 NS	ND	Ponte de Lima	ND	ND	ND	Soro
90	<i>C. lupus</i>	Larouco	ND	Montalegre	Bom	ND	ND	Soro

**Legenda:** F-fêmea; M-macho; ND-não determinado

**Anexo D.** Tabela com os resultados observados nas amostras dos animais analisados.

#	Bc	Bc2	Bc3	Bc4	Bc5	Di	Li	Li2	Tg	Ap	Ap2	Ap3	Ap4	Bb	Bb2	Ec	Ec2	Ec3	Rc	Rc2	Rc3	Ft	Ft2	Ft3	TOSV	TOSV2
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320		1:40	1:80	1:80	1:32	1:64	1:128	1:256	1:32	1:64	1:32	1:64	1:128	1:64	1:128	1:256	1:20	1:40	1:80	1:16	1:32
1	N					N	N		N	N	N			N		N	N		N			NA			N	N
2	N					N	P	N	N	N	N			N		N	N		N			NA			N	N
3	N					N	N		N	N	N			N		N	N		N			N			N	N
4	N					N	N		N	N	N			N		N	N		N			N			N	N
5	N					N	N		N	N	N			S		N	N		N			N			N	N
6	P	P	N			N	N		N	N	N			S		N	N		N			NA			N	N
7	N					N	N		N	N	N			N		N	N		N			N			N	N
8	P	P	N			N	N		N	N	N			N		N	N		N			NA			N	N
9	N					N	N		N	N	N			S		N	N		P	†		NA			N	N
10	N					N	N		N	N	N			N		P	P	P	P	†		NA			N	N
11	N					N	N		N	N	N			N		N	N		N			S	NA	NA	N	N
12	N					N	N		N	N	N			N		N	N		P	†		N			N	N
13	N					N	N		N	N	N			S		N	N		N			N			N	N
14	P	P	N			N	N		N	N	N			S		N	N		N			NA			N	N
15	N					N	N		N	N	N			N		N	N		N			N			N	N
16	P	P	N			N	N		N	N	N			N		N	N		N			N			N	N
17	N					N	N		N	N	N			S		N	N		N			N			N	N
18	N					N	P	N	N	N	N			N		N	N		N			N			N	N
19	N					N	N		N	N	N			N		N	N		N			N			N	N
20	N					N	N		N	N	N			N		N	N		N			NA			N	N
21	N					N	N		N	N	N			N		N	N		N			N			N	N
22	P	P	N			N	N		N	N	N			N		N	N		P	P	N	NA			N	N
23	N					N	N		NA	N	N			N		N	N		N			N			N	N
24	N					N	N		N	N	N			N		N	N		N			N			N	N
25	N					N	N		N	N	N			N		N	N		P	†		N			N	N
26	N					N	P	N	N	N	N			N		N	N		N			N			N	N
27	N					N	N		N	N	N			P	N	N	N		N			N			N	N
28	P	P	P	P	P	N	N		N	N	N			N		N	N		N			N			N	N
29	N					N	N		NA	N	N			N		N	N		N			N			N	N
30	N					N	N		NA	N	N			N		N	N		N			N			N	N

**Legenda:** P-positivo; N-negativo; NA-não analisado; S-suspeito; †-amostra esgotada; Bc-B. canis; Di-D. immitis; Li-L. infantum; Tg-T. gondii; Ap-A. phagocytophilum; Bb-B. burgdorferi s.l.; Ec-E. canis; Rc-R. conorii; Ft-F. tularensis; TOSV-vírus Toscana.

Anexo D. (continuação)

#	Bc	Bc2	Bc3	Bc4	Bc5	Di	Li	Li2	Tg	Ap	Ap2	Ap3	Ap4	Bb	Bb2	Ec	Ec2	Ec3	Rc	Rc2	Rc3	Ft	Ft2	Ft3	TOSV	TOSV2
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320		1:40	1:80	1:80	1:32	1:64	1:128	1:256	1:32	1:64	1:32	1:64	1:128	1:64	1:128	1:256	1:20	1:40	1:80	1:16	1:32
31	N					N	N		N	N	N			N		N	N		P	†		N			N	N
32	N					N	N		N	N	N			N		N	N		N			N			N	N
33	N					N	N		N	N	N			S		N	N		N			N			N	N
34	P	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N			N		N	N		N			N			N	N
35	N					N	N		N	N	N			N		N	N		N			N			N	N
36	N					N	N		P	N	N			S		N	N		N			N			N	N
37	N					N	N		N	N	N			P	N	N	N		N			NA			N	N
38	N					N	N		N	N	N			N		N	N		N			N			N	N
39	N					N	N		N	N	N			N		N	N		N			N			N	N
40	N					N	N		N	N	N			S		N	N		N			N			N	N
41	N					N	N		N	N	N			N		N	N		N			N			N	N
42	N					N	N		N	N	N			S		N	N		N			N			N	N
43	N					N	N		N	N	N			N		N	N		N			N			N	N
44	N					N	N		N	N	N			S		N	N		N			N			N	N
45	N					N	P	N	N	N	N			N		N	N		P	P	N	N			N	N
46	N					N	N		N	N	N			N		N	N		N			N			N	N
47	N					N	N		N	N	N			N		N	N		N			N			N	N
48	N					N	N		NA	N	N			N		N	N		N			N			N	N
49	N					N	N		N	N	N			N		N	N		P	N		NA			N	N
50	N					N	N		N	N	N			N		N	N		N			NA			N	N
51	N					N	N		N	N	N			S		N	N		N			N			N	N
52	N					N	N		P	N	N			N		N	N		N			N			N	N
53	N					N	N		N	N	N			S		N	N		P	P	P	N			N	N
54	N					N	P	N	N	N	N			S		N	N		P	P	N	N			N	N
55	N					N	N		N	N	N			S		N	N		P	P	N	N			N	N
56	N					N	N		P	N	N			S		N	N		N			N			N	N
57	N					N	N		N	N	N			P	NA	N	N		N			N			N	N
58	N					N	N		N	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
59	N					N	N		N	N	N			P	NA	N	N		N			N			N	N
60	N					N	N		N	N	N			S		N	N		P	N		NA			N	N

**Legenda:** P-positivo; N-negativo; NA-não analisado; S-suspeito; †-amostra esgotada; Bc-B. canis; Di-D. immitis; Li-L. infantum; Tg-T. gondii; Ap-A. phagocytophilum; Bb-B. burgdorferi s.l.; Ec-E. canis; Rc-R. conorii; Ft-F. tularensis; TOSV-vírus Toscana.

## Anexo D. (continuação)

#	Bc	Bc2	Bc3	Bc4	Bc5	Di	Li	Li2	Tg	Ap	Ap2	Ap3	Ap4	Bb	Bb2	Ec	Ec2	Ec3	Rc	Rc2	Rc3	Ft	Ft2	Ft3	TOSV	TOSV2
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320		1:40	1:80	1:80	1:32	1:64	1:128	1:256	1:32	1:64	1:32	1:64	1:128	1:64	1:128	1:256	1:20	1:40	1:80	1:16	1:32
61	N					N	N		N	N	N			S		N	N		N			NA			N	N
62	N					N	N		N	N	N			S		N	N		N			NA			N	N
63	N					N	N		N	N	N			P	S	N	N		N			N			N	N
64	N					N	N		N	N	N			S		N	N		N			NA			N	N
65	N					N	N		N	N	N			S		N	N		P	N		N			N	N
66	N					N	N		N	N	N			S		N	N		N			NA			N	N
67	N					N	N		N	P	P	P	N	S		N	N		P	P	P	N			S	S
68	N					N	N		N	P	S	N		P	P	N	N		P	P	P	N			N	N
69	N					N	N		N	N	N			N		N	N		N			N			N	N
70	N					N	N		N	N	N			S		N	N		P	P	N	N			S	S+
71	N					N	N		N	N	N			N		N	N		N			NA			N	N
72	N					N	N		N	N	N			P	N	N	N		N			NA			N	N
73	N					N	N		N	N	N			N		N	N		N			NA			N	N
74	N					N	N		N	N	N			N		N	N		N			NA			N	N
75	N					N	N		N	N	N			N		N	N		N			N			N	N
76	N					N	N		N	N	N			N		N	N		P	P	N	S	S	S	N	N
77	N					N	N		N	N	N			P	S	N	N		N			N			N	N
78	P	P	N			N	N		N	N	N			N		N	N		P	P	P	N			N	N
79	N					N	N		N	N	N			P	S	N	N		N			N			N	N
80	N					N	N		P	N	N			P	S	N	N		N			N			N	N
81	P	P	N			N	N		N	N	N			N		N	N		N			NA			N	N
82	P	P	N			N	N		N	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
83	N					N	N		N	N	N			N		N	N		N			N			N	N
84	N					N	N		N	N	N			S		N	N		N			N			N	N
85	N					N	N		N	N	N			N		P	P	P	N			N			N	N
86	N					N	N		N	N	N			N		N	N		N			N			N	N
87	N					N	N		N	N	N			N		N	N		N			NA			N	N
88	N					N	N		N	N	N			N		N	N		N			NA			N	N
89	N					N	N		N	N	N			N		N	N		N			N			N	N
90	N					N	N		N	N	N			S		N	N		P	P	P	N			N	N

**Legenda:** P-positivo; N-negativo; NA-não analisado; S-suspeito; †-amostra esgotada; Bc-*B. canis*; Di-*D. immitis*; Li-*L. infantum*; Tg-*T. gondii*; Ap-*A. phagocytophilum*; Bb-*B. burgdorferi* s.l.; Ec-*E. canis*; Rc-*R. conorii*; Ft-*F. tularensis*; TOSV-vírus Toscana.

**Anexo E.** Protocolo realizado para o teste de IFI de *L. infantum*, segundo as recomendações do fabricante (Leishmania-Spot IF, bioMérieux®).**REF 75 931****Leishmania-Spot IF**

Leishmania-Spot IF é um teste de serodiagnóstico de leishmanioses viscerais por imunofluorescência indirecta (IFI) no soro humano.

03565 E - PT - 2003/06

IVD

**INTRODUÇÃO E OBJECTIVO DO TESTE**

As leishmanioses são um grupo de doenças parasitárias devidas à contaminação do homem por um protozoário flagelado que pertence ao género *Leishmania*. O ciclo das *Leishmania* comporta a passagem alternada de um hospedeiro mamífero por um insecto vector, o flebotoma, e vice-versa. São observadas diferentes formas clínicas: leishmanioses viscerais, leishmanioses cutâneas, localizadas ou difusas, ou leishmanioses cutâneo-mucosas. A forma visceral (Kala-azar) é a mais grave das leishmanioses; deve-se às espécies *donovani* e *infantum* (1, 2).

A pesquisa imunológica dos anticorpos anti- *Leishmania infantum* com Leishmania-Spot IF é uma ajuda ao diagnóstico das leishmanioses viscerais.

**PRINCÍPIO**

Trata-se de uma reacção imunológica em duas etapas:

- As imunoglobulinas séricas humanas anti- *Leishmania infantum* eventualmente presentes na amostra fixam-se aos parasitas depositados nas lâminas de Leishmania-Spot IF. Os elementos não fixados são eliminados por lavagem.
- As imunoglobulinas fixadas são reveladas por imunoglobulinas de cabra anti-imunoglobulinas humanas marcadas com fluoresceína. Os elementos não fixados são eliminados por lavagem.

A leitura da reacção é efectuada com um microscópio de epifluorescência.

**COMPOSIÇÃO DO REAGENTE DA EMBALAGEM (10 TESTES):**

REF 75 931 10 x 10 círculos (6 mm)	Leishmania-Spot IF <i>Leishmania infantum</i> (forma promastigota), obtidas por cultura in vitro, inactivadas e fixadas em lâmina.	Lâminas prontas a usar. Cada lâmina é acondicionada numa saqueta/sachet estanque com um desidratante.
--	---	--

1 folheto informativo

**REAGENTES E MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS****Reagentes**

- Fluoline H, ref. 75 603.
- PBS, ref. 75 511.
- Evans Blue, ref. 75 491.
- Fluoprep, ref. 75 521.
- Reagentes auxiliares para as lavagens: PBS – Tween:
  - PBS, ref. 75 511
  - Tween 80

**Materiais**

- Microscópio de epifluorescência em luz UV (objectiva x 40).
- Lâminas (60 x 24 mm).
- Pipetas com pontas descartáveis que permitam a distribuição de 10 a 500 µl.

**PRECAUÇÕES DE UTILIZAÇÃO**

- **Somente para uso em diagnóstico in vitro.**
- **Unicamente para uso profissional.**
- Este dispositivo contém parasitas. É recomendado manipulá-los com as precauções de utilização relativas aos produtos potencialmente infecciosos.
- Não utilizar reagentes após a data de validade indicada na etiqueta da embalagem.
- Evitar o contacto com os olhos, a pele ou a roupa.
- Não pipetar as colheitas/coletas e os reagentes com a boca.
- Não utilizar nenhuma lâmina cuja saqueta/sachet esteja visivelmente alterada.
- Durante a identificação das lâminas, não utilizar tinta susceptível de ser dissolvida nos banhos de lavagem. Utilizar de preferência uma marcação com lápis.

**CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO**

- Conservar as lâminas a 2°-8°C.
- **Não congelar as lâminas.**
- Se as lâminas forem congeladas acidentalmente, não devem ser utilizadas.
- As lâminas são estáveis até à data de validade indicada na etiqueta da embalagem, se são conservadas nas condições exigidas.

**AMOSTRAS****Natureza e estabilidade das amostras**

Soros recentes ou congelados a -25° ± 6°C. Evitar as congelações e descongelações sucessivas. Rejeitar qualquer soro hemolisado, lipémico ou contaminado.

**PROCEDIMENTO**

1. Tirar da embalagem o número de lâminas necessário (uma lâmina por soro). Deixar as lâminas à temperatura do laboratório durante aproximadamente 15 minutos antes de abrir as saquetas/sachets.
2. Diluir os soros a analisar a 1/40 em PBS, e efectuar diluições sucessivas de 2 em 2 em PBS.
3. Colocar em cada círculo 10 µl de cada diluição de soro (uma diluição por círculo). Prever um testemunho conjugado (10 µl de PBS) por série de soros.
4. Incubar durante 30 min a 37°C ± 2°C em câmara húmida.
5. Preparar o PBS-Tween: a 1 litro de PBS, acrescentar 65 µl ± 5 µl de Tween 80.
6. Lavar as lâminas em PBS-Tween 2 vezes durante 5 min. Passar rapidamente por um banho de água destilada. Escorrer. Secar.
7. Preparar o conjugado:
  - Diluir em PBS a Fluoline H na diluição previamente determinada (consultar o folheto informativo da Fluoline H, ref. 75 603).

Leishmania-Spot IF

03565 E - PT - 2003/06

A taxa de diluição do conjugado varia com cada lote e deve ser verificada em função dos aparelhos utilizados.

**Exemplo de diluição do conjugado:** para uma Fluoline H cujo título indicado é 400, a diluição a utilizar para o diagnóstico de leishmaniose por IFI foi de 1/100 nos nossos laboratórios com um microscópio de epifluorescência.

- Acrescentar o Evans Blue (ref. 75 491) (50 µl de Evans Blue em 5 ml de fluolina diluída).

8. Cobrir cada círculo (inclusive o testemunho) com 10 µl de conjugado.
9. Incubar durante 30 min a 37°C ± 2°C em câmara húmida.
10. Lavar as lâminas em PBS-Tween 2 vezes durante 5 min. Passar rapidamente por um banho de água destilada. Secar.
11. Colocar 2 gotas de Fluoprep (ref. 75 521) em cada lâmina. Cobrir com uma lamela.

**LEITURA**

Antes de ler as amostras, verificar a ausência de fluorescência do testemunho conjugado. Se o testemunho apresentar uma fluorescência, a série não deverá ser validada e as amostras terão de ser testadas numa outra série.

- **Reacção negativa:** as leishmanias ficam coradas de vermelho, vermelho alaranjado ou verde escuro. Não foi observada nenhuma fluorescência de membrana.
- **Reacção positiva:** as leishmanias apresentam uma coloração do citoplasma verde claro mais ou menos fluorescente. A fluorescência é sobretudo nítida ao nível da membrana e do flagelo quando este último for visível.

**RESULTADOS**

**Título do soro:** inverso da maior diluição que demonstra ainda uma reacção positiva.

**INTERPRETAÇÃO**

- Títulos de 80 no adulto e de 40 na criança são valores ditos de alerta e devem ser verificados por outra técnica e, eventualmente, confirmados pelo exame de uma amostra sérica colhida/coletada 3 semanas mais tarde (3).
- Um título superior a 160 permite afirmar uma reacção positiva (3).
- Sob o efeito do tratamento, o título dos anticorpos só diminui de forma significativa após vários meses (4).

**Nota:**

A interpretação dos resultados do teste deve ser efectuada tendo em conta o contexto clínico e, eventualmente, os resultados de outros testes.

**CONTROLO DE QUALIDADE**

Um controlo de qualidade dos reagentes deve ser efectuada na abertura de uma nova embalagem e em cada série de testes com um soro positivo de título conhecido.

**Nota**

É da responsabilidade do utilizador assegurar que o controlo de qualidade é executado de acordo com a legislação local em vigor.

**LIMITES DO TESTE**

- O antígeno *L. infantum* detecta os anticorpos das leishmanioses viscerais mediterrâneas (nenhum ou poucos anticorpos circulantes nas formas cutâneas) (5).
- Podem ser observadas reacções cruzadas com algumas parasitoses; outras leishmanioses, paludismo, e classicamente com as tripanosomioses em especial na doença de Chagas (6).
- A interpretação dos resultados do teste deve ser efectuada tendo em conta o contexto clínico e, eventualmente, os resultados de outros testes.

**VALORES ESPERADOS**

A prevalência mundial foi avaliada em 12 milhões de casos. A incidência anual global é avaliada em 1,5 a 2 milhões de casos para a leishmaniose cutânea e 500 000 para a leishmaniose visceral (7). As leishmanioses estão presentes nos 5 continentes: nas zonas tropicais e sub-tropicais de 88 países (7).

**COMPORTAMENTO FUNCIONAL**

Foi efectuada um estudo baseado em 323 indivíduos. Entre os quais, 75 eram doadores sãos, 21 tinham leishmaniose visceral documentada, 72 suspeitos de leishmaniose, 155 com parasitoses que não a leishmaniose (8).

Os soros foram testados com Leishmania-Spot IF e comparados com o diagnóstico estabelecido nos dados clínicos. Os resultados obtidos estão indicados nos quadros abaixo.

Estado dos pacientes	Total	Positivo	Negativo
Leishmaniose	21	21	0
Suspeita de leishmaniose	72	17*	55**
Infeção com protozoário	70	2	68
Malaria	30	2	28
Schistosomiose	30	0	30
Amibiase	25	2	23
Doadores sãos	75	0	75

\* Nestes 17 pacientes, 13 foram confirmados terem leishmaniose.

\*\* Nestes 55 pacientes, 2 revelaram-se terem leishmaniose.

		Diagnóstico clínico		
Leishmania Spot IF		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	34	10	44
	Negativo	2	277	279
	Total	36	287	323

**Sensibilidade:** 94,4 %

**Intervalo de confiança a 95 %:** [81,3 % - 99,3 %].

**Especificidade:** 98,5 %

**Intervalo de confiança a 95 %:** [93,6 % - 98,1 %].

**Anexo F.** Protocolo realizado para o teste de IFI de *B. canis*, segundo as recomendações do fabricante (MegaScreen® FLUOBABESIA canis).

Instructions for use (Version 06/2006)

**VI TEST PROCEDURE**

Kit components should be stored at 2-8°C. Bring them to room temperature (20-25°C) before opening bottles or slides foil pouches. The conjugate has always to be stored in the dark!

1. Remove warm slide carefully from the foil pouch, label it with a patient name or ID number (Fig.1).
2. Prepare two-fold dilution dilutions for all untested sera starting **with 1:16 or prepare 1:32 screening dilution**. For sera found positive on a previous assay run, prepare serial two-fold dilutions in PBS, starting with 1:32 to determine the highest or end-point titer.
3. The Positive Control is ready to use (1:40 prediluted).
4. For each serum dilution to be tested **add 10 µl** to the associated well and record the location for later reference. For each assay run include a Negative control and dilutions of the Positive control prepared above. Application of sera should be done from the edge of the substrate wells (Fig. 2).
5. Put the slide into a humid chamber and incubate for 30 minutes at 37°C.
6. Remove humid chamber from incubator. Rinse slide wells (if using a wash bottle please focus a gently stream on the middle of the slide, not directly on the antigen wells ) with PBS (Fig. 3a). Shake or tap beaded PBS from slides into a sink with PBS then repeat this wash step 2x 5 minutes (Fig. 3b). Do not allow the wells to dry between the wash steps! Take out the slides and tap them gentle on a pulp (Fig. 4).
7. Add immediately 1 drop of anti-Dog-IgG-FITC Conjugat on each well (Fig. 5). Application of sera or conjugate should be done from the edge of the substrate wells. Then return slides to the humid chamber for another 30 minutes incubation at 37°C. Incubation should be in the dark to protect the photosensitive conjugate.
8. Wash slides as in step 6, above.
9. Add 2 drops of Mounting Fluid on the coverslip and place carefully the slide on it removing air bubbles caught between coverslip and slight (Fig. 6).
10. Read the stained substrate slides at 400X magnification, comparing each well to the visual intensity and appearance of the Babesia canis fluorescence pattern seen in the Positive and Negative control wells. Slides may be stored at 2-8°C in the dark for up to 24 hours.

**VII TEST EVALUATION**

**A positive reaction** appears as bright, sharp, regular stained inclusion bodies seen in the cytoplasm or exceptionally outside (in case of bursted erythrocytes) of infected erythrocytes. The size, appearance and density of the inclusions (merozoite) must be compared with the Positive and Negative Control reactions. Patterns of reactivity different than that seen in the Positive Control must be considered non-specific.

**Weak positive** at  $\geq 1:32$  screening dilution: IgG titers of 1:32 up to 1:64.

**Positive** at  $\geq 1:128$  screening dilution: IgG titers of 1:128 up to 1:256 are considered to reflect infection at an undetermined time.

**High positive** at  $> 1:256$  screening dilution: IgG titers of  $> 1:256$  are considered to reflect infection at an undetermined time.

All positive Sera are considered to reflect infection at an undetermined time. Sera at the  $\geq 1:32$  screening dilution should be return to determine their endpoint titer for comparison with earlier or later specimens from the same dog.

**Doubtful** at 1:16 to  $< 1:32$

**Negative** at  $< 1:16$ : Report as negative for *B. canis* antibody.

**NOTE!** Because of antibody concentrations under detection limit in the first 10 days post infection it is recommendable to make a second test 14 days later.

**Expected values**

The prevalence of Babesia canis IgG-antibodies varies depending upon the geographic region and population being tested. Serologic test results should be always interpreted in conjunction with case history and clinical symptoms.



**Anexo G.** Protocolo realizado para o teste de IFI de *T. gondii*, segundo as recomendações do fabricante (MegaScreen® FLUOTOXOPLASMA g).

Information for use (Version 11/2006)

### VI. TEST PROCEDURE

Slides should be stored at -20°C. Bring them to room temperature (20-25°C) before opening bottles or slides foil pouches. The conjugate has always to be stored in the dark!

1. Remove warm slide carefully from the foil pouch, label it with a patient name or ID number (Fig.1).
2. Prepare 1:50 screening dilution's for all untested sera. For sera found positive on a previous assay run, prepare serial two-fold dilution's in PBS, starting with 1:50 to determine the endpoint titer.
3. The Positive and Negative controls are ready to use! For each assay run add 20 µl of the Negative and 20 µl Positive control (Fig.2).
4. For each serum dilution to be tested add 20 µl to the associated well and record the location for later reference. Application of sera should be done from the edge of the substrate wells.
5. Put the slide into a humid chamber and incubate for 30 minutes at 37°C.
6. Remove humid chamber from incubator. Rinse slide wells (if using a wash bottle please focus a gently stream on the middle of the slide, not directly on the antigen wells ) with PBS (Fig. 3a). Shake or tap beaded PBS from slides into a sink with PBS then repeat this wash step 2x 5 minutes (Fig. 3b). Do not allow the wells to dry between the wash steps! Take out the slides and tap them gentle on a pulp (Fig. 4).
7. Add immediately 1 drop of anti-Cat-IgG-FITC Conjugat on each well (Fig. 5). Application of sera or conjugate should be done from the edge of the substrate wells. Then return slides to the humid chamber for another 30 minutes incubation at 37°C. Incubation should be in the dark to protect the photosensitive conjugate.
8. Wash slides as in step 6, above.
9. Add 2 drops of Mounting Fluid on the coverslip and place carefully the slide on it removing air bubbles caught between coverslip and slight (Fig. 6).
10. Read the stained substrate slides at 400X magnification, comparing each well to the visual intensity and appearance of the fluorescence pattern seen in the Positive and Negative control wells. Slides may be stored at 2-8°C in the dark for up to 7 days.




Fig. 1




Fig. 2




Fig. 3a




Fig. 4




Fig. 5




Fig. 6

### VII. TEST EVALUATION

**Positive Testresult at ≥ 1:50 screening dilution:**  
IgG- titers of 1:50 and greater are considered to reflect infection at an undetermined time. Sera positive at the above described screening dilution should be return to determine their endpoint titer for comparison with earlier or later samples from the same animal.

**If positive** the stained *Toxoplasma* tachyzoits show a bright, sharp and regular green fluorescence of the whole membrane. The size, appearance and density of the characteristic fluorescences must be compared with the Positive and Negative control reactions. Patterns of reactivity different than that seen in the Positive control must be considered non-specific.

**Expected values**  
The prevalence of *Toxoplasma gondii* IgG-antibodies varies depending upon the geographic region and population being tested. Serologic test results should be always interpreted in conjunction with case history and clinical symptoms.

**Negative Testresult at < 1:50 screening dilution:**  
Apical staining or pole-fluorescence of the tachyzoit membrane or even red fluorescence of the tachyzoits due to the Evans blue counterstain is to be considered negative for *Toxoplasma gondii* antibodies.

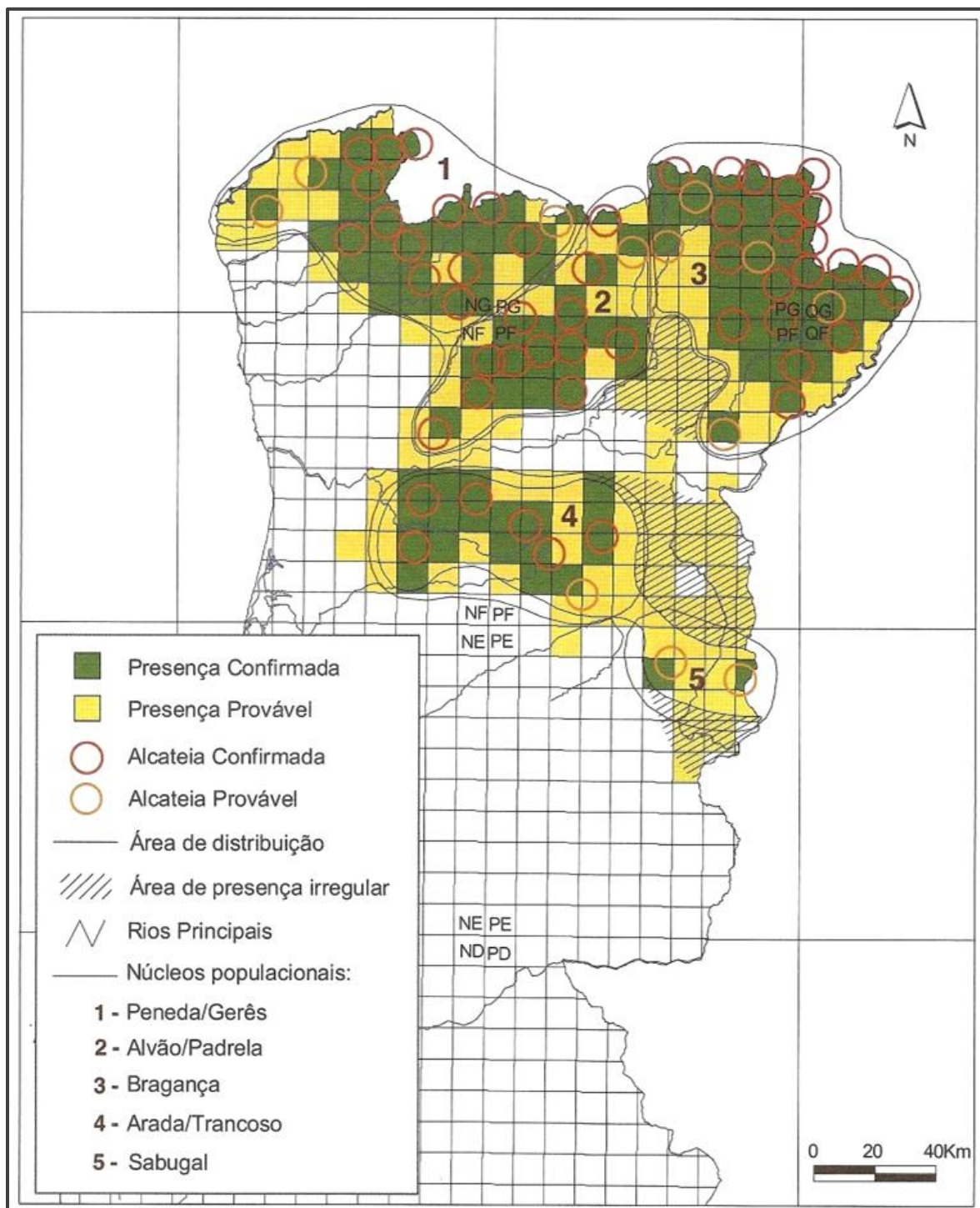
**NOTE**  
*Toxoplasma gondii* is a protozoan parasite that is very closely related structurally, genetically and immunologically to *Neospora caninum*. Due to the close similarity between these two organisms, serological diagnosis is complicated by the potential of false positive results due to antigenic cross reactivity. Therefore the interpretation of the test results should be taken using all available information (case history, clinical features a.s.o.).

**Anexo H.** Protocolo realizado para o teste de IMR de *D. immitis*, segundo as recomendações do fabricante (WITNESS Dirofilaria, Synbiotics Europe®).

<p><b>AMOSTRAS</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>O teste pode ser realizado em sangue total, soro ou plasma. Para o sangue total, a amostra deve ser colhida com anticoagulante (EDTA ou heparina).</li> <li>As amostras devem ser sempre colhidas com seringa e agulha estéreis.</li> <li>A hemólise não interfere significativamente com o teste, se bem que uma amostra fortemente hemolizada possa estar na origem de uma interferência (hemoglobina), podendo prejudicar a leitura em casos de reacção fracamente positiva.</li> </ul> <p><b>Conservação das amostras</b></p> <p>As amostras devem ser testadas, de preferência imediatamente após a colheita, mas não mais de 4 horas depois, se forem conservadas à temperatura ambiente. Se a análise for adiada (até dois dias), a amostra deverá ser conservada refrigerada entre +2° e 8°C. Para uma conservação mais prolongada, será aconselhável congelar a amostra (plasma ou soro somente) a -20°C.</p> <p><b>CONTEÚDO DO KIT</b></p> <p>A. 10 saquetas, contendo cada uma, 1 placa teste e uma saqueta desidratante. B. Um frasco conta-gotas de solução tampão (de 2,8 ml). C. Uma literatura. D. 10 pipetas.</p> <p><b>PRECAUÇÕES</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Não utilizar reagentes após a data de validade.</li> <li>Conservar o kit entre +2° e +25°C. Não congelar.</li> <li>Utilizar o teste após a abertura (nos 10 minutos após a abertura da saqueta).</li> <li>Evitar tocar ou danificar as membranas reactivas (janela da amostra (1) e janela de leitura (2) e (3)).</li> <li>Colocar a placa WITNESS sobre uma superfície plana e horizontal para permitir uma migração correcta da amostra.</li> <li>Utilizar uma pipeta diferente para cada amostra.</li> <li>Segurar a pipeta e o frasco de solução tampão na vertical quando da distribuição das amostras e do reagente.</li> <li>Manipular as amostras e o material de análise como susceptíveis de transmitir a <i>D. immitis</i>.</li> <li>Apenas para uso veterinário.</li> </ol>	<p><b>REALIZAÇÃO DO TESTE - RESULTADOS</b></p> <p><i>Importante :</i> Deixe cair as gotas da amostra e da solução tampão sobre a membrana da cúpula da amostra (janela 1). Não colocar a ponta da pipeta nem as gotas da amostra e da solução tampão directamente em contacto com a membrana.</p> <table border="1"> <tr> <td data-bbox="1153 566 1601 869"> <p><b>1. Repartição da amostra</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Abrir uma saqueta, retirar a pipeta e a placa teste e colocá-la sobre uma superfície plana e horizontal.</li> <li>Colher a amostra com a pipeta fornecida e, mantendo-a bem vertical, colocar uma gota na janela da amostra (1).</li> </ul> </td><td data-bbox="1601 566 2049 869"> <p><b>2. Repartição da solução tampão</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Depois de ter a certeza de que a amostra penetrou bem na membrana ;</li> <li>Tirar a tampa do frasco de solução tampão e, segurando-o sempre na vertical, colocar três gotas de solução na janela da amostra (1).</li> <li>Deixar em seguida a placa teste, sempre na horizontal, durante todo o tempo da migração do complexo amostra/reagente sobre a banda reactiva.</li> </ul> </td></tr> <tr> <td data-bbox="1153 869 1601 1181"> <p><b>3. Leitura do teste</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Observar ao fim de 10 minutos a presença ou não de faixas de cor rosa nas janelas (2) e (3).</li> </ul> <p><i>Notas</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>É possível concluir a leitura do teste antes de 10 minutos, se as duas faixas de cor rosa (correspondendo respectivamente à faixa teste (2) e à faixa testemunha (3)) aparecerem nitidamente ;</li> <li>Pelo contrário, o aparecimento somente de uma faixa cor de rosa ao nível da faixa (3) não permite concluir o teste antes de decorrerem os 10 minutos necessários ao seu desenvolvimento completo.</li> </ul> <p>Com efeito, esta faixa de controlo (3) pode aparecer cor-de-mais precocemente que a faixa teste (2), nomeadamente no caso de amostras fracamente positivas.</p> </td><td data-bbox="1601 869 2049 1181"> <p><b>RESULTADOS</b></p> <p><b>1. Validação</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>O teste é validado se uma faixa cor de rosa aparecer na janela de leitura correspondente à testemunha (3).</li> </ul> <p><b>2. Interpretação</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Ausência de uma faixa cor de rosa ao nível da janela (2) e aparecimento de uma faixa cor de rosa ao nível da janela (3) : negativo em antígeno <i>D. immitis</i>.</li> <li>Presença de uma faixa cor de rosa ao nível das janelas (2) e (3) : positivo em antígeno <i>D. immitis</i>.</li> </ul> <p><b>Atenção:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>A ausência de uma faixa cor de rosa no nível da janela (3) torna o teste não válido.</li> <li>A interpretação de qualquer teste de diagnóstico deve ser feita em função do contexto clínico e epidemiológico do animal testado.</li> </ul> </td></tr> </table>	<p><b>1. Repartição da amostra</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Abrir uma saqueta, retirar a pipeta e a placa teste e colocá-la sobre uma superfície plana e horizontal.</li> <li>Colher a amostra com a pipeta fornecida e, mantendo-a bem vertical, colocar uma gota na janela da amostra (1).</li> </ul>	<p><b>2. Repartição da solução tampão</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Depois de ter a certeza de que a amostra penetrou bem na membrana ;</li> <li>Tirar a tampa do frasco de solução tampão e, segurando-o sempre na vertical, colocar três gotas de solução na janela da amostra (1).</li> <li>Deixar em seguida a placa teste, sempre na horizontal, durante todo o tempo da migração do complexo amostra/reagente sobre a banda reactiva.</li> </ul>	<p><b>3. Leitura do teste</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Observar ao fim de 10 minutos a presença ou não de faixas de cor rosa nas janelas (2) e (3).</li> </ul> <p><i>Notas</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>É possível concluir a leitura do teste antes de 10 minutos, se as duas faixas de cor rosa (correspondendo respectivamente à faixa teste (2) e à faixa testemunha (3)) aparecerem nitidamente ;</li> <li>Pelo contrário, o aparecimento somente de uma faixa cor de rosa ao nível da faixa (3) não permite concluir o teste antes de decorrerem os 10 minutos necessários ao seu desenvolvimento completo.</li> </ul> <p>Com efeito, esta faixa de controlo (3) pode aparecer cor-de-mais precocemente que a faixa teste (2), nomeadamente no caso de amostras fracamente positivas.</p>	<p><b>RESULTADOS</b></p> <p><b>1. Validação</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>O teste é validado se uma faixa cor de rosa aparecer na janela de leitura correspondente à testemunha (3).</li> </ul> <p><b>2. Interpretação</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Ausência de uma faixa cor de rosa ao nível da janela (2) e aparecimento de uma faixa cor de rosa ao nível da janela (3) : negativo em antígeno <i>D. immitis</i>.</li> <li>Presença de uma faixa cor de rosa ao nível das janelas (2) e (3) : positivo em antígeno <i>D. immitis</i>.</li> </ul> <p><b>Atenção:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>A ausência de uma faixa cor de rosa no nível da janela (3) torna o teste não válido.</li> <li>A interpretação de qualquer teste de diagnóstico deve ser feita em função do contexto clínico e epidemiológico do animal testado.</li> </ul>
<p><b>1. Repartição da amostra</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Abrir uma saqueta, retirar a pipeta e a placa teste e colocá-la sobre uma superfície plana e horizontal.</li> <li>Colher a amostra com a pipeta fornecida e, mantendo-a bem vertical, colocar uma gota na janela da amostra (1).</li> </ul>	<p><b>2. Repartição da solução tampão</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Depois de ter a certeza de que a amostra penetrou bem na membrana ;</li> <li>Tirar a tampa do frasco de solução tampão e, segurando-o sempre na vertical, colocar três gotas de solução na janela da amostra (1).</li> <li>Deixar em seguida a placa teste, sempre na horizontal, durante todo o tempo da migração do complexo amostra/reagente sobre a banda reactiva.</li> </ul>				
<p><b>3. Leitura do teste</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Observar ao fim de 10 minutos a presença ou não de faixas de cor rosa nas janelas (2) e (3).</li> </ul> <p><i>Notas</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>É possível concluir a leitura do teste antes de 10 minutos, se as duas faixas de cor rosa (correspondendo respectivamente à faixa teste (2) e à faixa testemunha (3)) aparecerem nitidamente ;</li> <li>Pelo contrário, o aparecimento somente de uma faixa cor de rosa ao nível da faixa (3) não permite concluir o teste antes de decorrerem os 10 minutos necessários ao seu desenvolvimento completo.</li> </ul> <p>Com efeito, esta faixa de controlo (3) pode aparecer cor-de-mais precocemente que a faixa teste (2), nomeadamente no caso de amostras fracamente positivas.</p>	<p><b>RESULTADOS</b></p> <p><b>1. Validação</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>O teste é validado se uma faixa cor de rosa aparecer na janela de leitura correspondente à testemunha (3).</li> </ul> <p><b>2. Interpretação</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Ausência de uma faixa cor de rosa ao nível da janela (2) e aparecimento de uma faixa cor de rosa ao nível da janela (3) : negativo em antígeno <i>D. immitis</i>.</li> <li>Presença de uma faixa cor de rosa ao nível das janelas (2) e (3) : positivo em antígeno <i>D. immitis</i>.</li> </ul> <p><b>Atenção:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>A ausência de uma faixa cor de rosa no nível da janela (3) torna o teste não válido.</li> <li>A interpretação de qualquer teste de diagnóstico deve ser feita em função do contexto clínico e epidemiológico do animal testado.</li> </ul>				



**Anexo I.** Presença de lobo por UTM 10x10 km, alcateias detectadas, áreas de distribuição (presença regular) e de presença irregular estimadas, e núcleos populacionais identificados (Pimenta et al. 2005).



**Anexo J.** Sobreposição da área de distribuição do lobo e das alcateias detectadas com o mapa da temperatura média anual (Pimenta et al., 2005).

